
TRATAT DE
MICRIOBOLIOIIE
GENERALA

G. ZARNEA

TRATAT de MICROBIOLOGIE GENERALĂ



VIROLOGIE GENERALĂ ANATOMIE BACTERIANĂ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1983

Cuprins

ANATOMIE BACTERIANĂ

Prefață

Microbiologia, una dintre cele mai dinamice științe biologice, și-a marcat încă de la începuturile sale tendința de implicare în diferite domenii ale activităților umane, de a deschide noi orizonturi și de a influența evoluția altor domenii ale biologiei. In ultimele decenii, impactul microbiologiei asupra dezvoltării științelor biologice, în general, este ilustrat, în primul rînd, de rolul său esențial în transformările profunde aduse de revoluția biologiei moleculare care au permis — într-o perioadă scurtă de timp — înțelegerea aprofundată a unui număr important de procese și fenomene caracteristice organismelor vii.

Cunoașterea aprofundată a biologiei bacteriei E. coli, *descoperirea plasmidelor, a fenomenului de restricție la bacterii și a enzimelor care acționează asupra moleculei de ADN au dus la elaborarea tehnologiilor ingineriei genetice și au deschis calea unei noi revoluții în biologie, revoluția bioindustrială (biotehnologică), bazată în special pe utilizarea în industrie a microorganismelor reprogramate genetic pentru a efectua anumite activități utile.*

În această situație, realizarea unei sinteze a cunoștințelor actuale de microbiologie generală la nivelul unui tratat — primul de acest gen în țara noastră — ni s-a părut ca avînd o importanță esențială pentru numărul mare de specialiști care lucrează sau vor lucra în domeniul științelor microbiologice și al aplicațiilor lor. Realizarea unei astfel de sinteze, într-o concepție unitară, este în mod cert o întreprindere foarte dificilă, datorită volumului imens de date acumulate în ultimii ani și mai ales dinamismului acestor științe.

Prezentînd celor interesați primul volum al Tratatului de microbiologie generală *mă gîndesc cu recunoștință la numeroșii oameni de știință care, răspunzînd solicitărilor mele, mi-au oferit lucrările lor, permițîndu-mi acumularea unui număr foarte mare de extrase (lucrări originale, reviste generale etc.), care stau la baza concepției și informațiilor din acest tratat. Datorită acestui fapt, bibliografia care însoțește fiecare mare capitol este numai limitată și selectivă, fiind restrînsă la lucrări originale și reviste de ansamblu care pot permite cititorilor o cunoaștere mai aprofundată a problemelor tratate.*

Prezența părții de Virologie generală *în structura primului volum — în dezacord cu concepția exprimată în tratat privind natura virusurilor — este determinată de doi factori și anume: de numeroasele interferențe dintre cunoștințele fundamentale de virologie și cele de microbiologie generală, genetica microorganismelor, imunobiologie, ecologia microorganismelor etc., cu care se*

corelează pe parcursul lucrării, și de faptul că numeroase date experimentale acumulate în ultimii ani demonstrează faptul că virusurile animale, prin unele dintre proprietățile lor, formează o punte de legătură între microbiologie și biologia celulei eucarite în general. Ele se comportă ca unități genetice care acționează individual, dar au unele particularități generale ale celulelor lor gazdă în care sînt replicate, din genomul cărora probabil derivă și cu care au avut o evoluție similară, decurgînd din necesitatea de a folosi cu randament maxim „mașinăria" de sinteză a acestora. De aceea, această parte este limitată numai la anumite aspecte și nu epuizează problematica domeniului respectiv.

Volumele următoare vor cuprinde probleme referitoare la metabolismul, creșterea și multiplicarea, originea și evoluția, sistematica și taxonomia microorganismelor, genetica bacteriană și virală, ecologia microorganismelor, microbiologia solului, hidro- și geomicrobiologia, microbiologia industrială și biotehnologiile microbiene.

Mulțumesc cu recunoștință dr. Lucia Dumitru, fără al cărui ajutor deosebit de competent, spirit de ordine și perseverență, elaborarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă, și Marianei Frățilă, a cărei disciplină în muncă și răbdare au fost de importanță esențială în clasarea și ordonarea bogatului material bibliografic și ilustrativ.

Exprimînd speranța că această lucrare va fi utilă unui cerc larg de cititori, vom primi cu recunoștință orice observație directă, colegială, care ar putea contribui la îmbunătățirea volumelor care vor urma.

AUTORUL

Istoricul microbiologiei

„The most important discoveries of the laws, methods and progress of nature have nearly always sprung from the examination of the smallest-objects which she contains"

J. D. LAMARCK

Microbiologia este o știință abia cu cîteva decenii mai mult decît centenară datorită faptului că punerea în evidență și descrierea microorganismelor nu au fost posibile decît după construirea unui instrument optic care să le facă accesibile observației — *microscopul* *).

Microorganismele, care reprezintă obiectul de studiu al microbiologiei, alcătuiesc un grup vast și eterogen ca morfologie, activitate biologică și poziție sistematică, avînd drept caractere comune dimensiunile, microscopice, care le fac invizibile cu ochiul liber, organizarea, în general unicelulară, și structura internă relativ simplă. În acest grup sînt incluse bacteriile, ciupercile microscopice (mucegaiurile și drojdiile), unele alge și protozoarele. În mod obișnuit, la lumea microorganismelor considerată ca obiect de studiu se atașează și virusurile — entități corpusculare de dimensiuni infime, alcătuite din componentele chimice esențiale și definitorii ale organismelor vii, proteine și acizi nucleici, dar lipsite de atributele structurale și funcționale ale organizării celulare, ceea ce le face inapte de a exista autonom și de a se multiplica în afara unei celule vii, fapt ce le obligă la un parazitism intracelular absolut.

Descoperirea microorganismelor

Existența microorganismelor, bănuită de Kircher (1655), a fost descoperită în anul 1675, în urma observațiilor lui Antonie van Leeuwenhoek** (1632—1723), care, spre deosebire de predecesorii săi, a folosit un „microscop" simplu, o lupă de construcție proprie, avînd avantajul de a fi mai puțin sensibilă la aberațiile optice, o putere de mărire de 40 — cîteva sute de diametre (putere de rezoluție ~ 1 μm) și un sistem de iluminare

---

*) Primul microscop compus — care nu a fost folosit pentru studiul microorganismelor — a fost construit în jurul anului 1590 de Cornelius Drebbel sau de frații Zaccharias și Hans Jansen din Middelburg, sub forma unui instrument lung de aproape 2 m. După anul 1610, Galileo Galilei construiește un instrument similar. Denumirea de „microscop" pare să fi fost creată de Demisciano, de la Academia dei Lincei (1614), sau de Johannes Faber von Bamberg; Francis Bacon, în opera sa „Novum Organon" (1620), dădea acestui dispozitiv denumirea de „perspicillum". Robert Hooke a reușit să corijeze unele dintre defectele primelor microscoape compuse, ameliorind sistemul de iluminare, fără să reușească să le îmbunătățească sensibil puterea separatoare.

**) Numele și prenumele lui Leeuwenhoek au fost scrise de el însuși în 19 modalități diferite, fapt care explică diferențele în scrierea lor și în prezent.

nedivulgat, probabil de tipul „cîmp întunecat"(fig. 1,2). Leeuwenhoek a observat, printre altele, numeroase microorganisme, alge unicelulare, flagelate, levuri şi bacterii cărora le-a dat denumirea generică de „animalcule" (animale mici), făcînd aprecieri juste asupra dimensunilor lor, prin simple deducţii matematice. Rezultatele cercetărilor sale nu au caracterul unui studiu sistematic, organizat şi extins asupra unor subiecte definite,



Fig. 1. — Antonie van Leeuwenhoek (1632—1723).

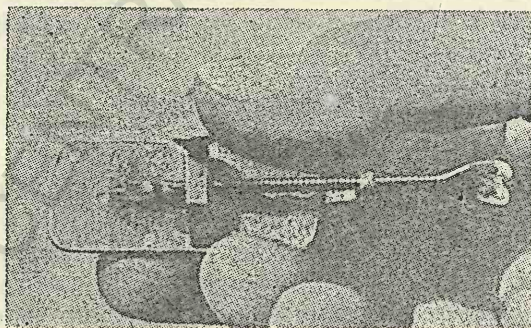


Fig. 2. — Microscopul lui Leeuwenhoek. Lentila este plasată în zona centrală a unei plăci de metal, iar obiectul de studiat pe vîrful ascuţit al unui şurub, care permite reglarea, prin deplasarea înainte şi înapoi (copie după Archives of the American Society for Microbiology).

ci reprezintă mai curînd observaţiile izolate ale unui cercetător curios asupra diferitelor medii naturale (salivă, puroi, apă de canal, sînge etc.); aceste rezultate au fost comunicate în aproximativ 200 de scrisori către „Royal Society of London" (Dobell, 1932) şi publicate în lucrarea sa

„Arcana naturae ope microscopiorum detecta" („Tainele naturii descoperite cu ajutorul microscoapelor") din 1675. Kluyver (1941) consideră ca zi de naștere a bacteriologiei data de 24 aprilie 1676, cînd Leeuwenhoek comunică observațiile sale asupra dezvoltării „animalculelor" în apa cu boabe de piper dintr-un flacon închis ermetic timp de 3 săptămîni (considerată prima observație asupra unei fermentații anaerobe)*).



Fig. 3. — Louis Pasteur (1822—1895).

În secolul al XVIII-lea, celebrul botanist Carl Linnaeus (1707—1778), încercînd în opera sa „Systema Naturae" (1735) o grupare sistematică a viețuitoarelor cunoscute, reunește toate microorganismele într-un singur grup, numit semnificativ „*Chaos*". În 1775, Terehovski a publicat lucrarea „De Chao Infusorii Linnaei" în care, bazîndu-se pentru prima dată pe metode experimentale, demonstrează că ființele foarte mici observate în diferite infuzii bogate în substanțe organice cresc, se divid și se mișcă datorită unor forțe interne proprii și ajunge la concluzia că aceste organisme sînt adevărate animale în miniatură.

Microbiologia a luat naștere ca știință abia prin lucrările marelui savant francez Louis Pasteur (1822—1895), care a stabilit principiile sale de bază, valabile și astăzi, și a făcut descoperiri de importanță teoretică și practică fundamentală (fig. 3).

---

*) Cu toate acestea, Smit și Heniger (1975), evidențiind meritele lui Leeuwenhoek de a fi atras atenția asupra lumii microorganismelor, cu ocazia tricentenarului descoperirii bacteriilor, nu-l consideră descoperitorul bacteriilor, deoarece nu le-a acordat statutul unor organisme aparte, ci le-a considerat ca „animale foarte mici", forme juvenile ale „animalelor mici" (protozoare).

Studii asupra fermentaţiilor

Leeuwenhoek a examinat mustul de bere şi a descris „globulele" din el, iar Becher (1682) a arătat că numai lichidele zaharate fermentează producînd alcool. Studiul ştiinţific experimental al fermentaţiilor nu a fost posibil decît la sfîrşitul secolului al XVIII-lea, odată cu naşterea chimiei, cînd s-a demonstrat natura gazului produs — CO_2 (Mac Bride, 1764) şi faptul că proporţia lui corespunde ponderal la 57 % din zahărul fermentat (Cavendish, 1766). Lavoisier (1789) a demonstrat că fermentaţiile ascultă de aceleaşi legi cantitative ca şi reacţiile chimice obişnuite şi deşi le considera ca procese pur chimice recunoaşte capacitatea levurilor de a le declanşa. Cagniard-Latour (1836), precum şi Schwann şi Kutzing (1837) au descris independent levurile prezente în cursul fermentaţiei alcoolice ca organisme vii, probabil plante, care se înmulţesc prin înmugurire şi care au funcţia fiziologică de conversie a zahărului în alcool etilic şi CO_2.

Natura biologică a fermentaţiilor a rămas totuşi obiectul unor vii controverse, cei mai mari chimişti ai timpului considerînd că manifestările aparent misterioase ale vieţii pot fi explicate numai prin jocul forţelor fizice şi chimice şi că levurile sînt fie substanţe albuminoase precipitate, care acţionează ca un catalizator al fermentaţiei, fie fiinţe vii a căror proliferare este consecinţa şi nu cauza fermentaţiei.

Primele cercetări ale lui Pasteur asupra fermentaţiilor au fost legate de fenomenul *asimetriei moleculare*. El demonstrează (1848) că acidul tartric racemic, compus inactiv pentru lumina polarizată, este un amestec echimolecular de acid dextrogir şi acid levogir, ale căror cristale sînt de forme asimetrice şi enantiomorfe. Această descoperire a dus mai tîrziu pe Le Bel şi van't Hoff (1874) la concepţia structurii tetraedrice a atomului de carbon, noţiune care stă la baza chimiei organice moderne. Tot Pasteur (1858) evidenţiază stereospecificitatea organismelor vii : soluţia de tartrat racemic însămînţată cu mucegaiul *Penicillium glaucum* redevine optic activă ; mucegaiul degradează izomerul dextrogir, lăsîndu-l intact pe cel levogir, care astfel poate fi izolat în stare pură. Această descoperire, pe lîngă faptul că furniza un procedeu simplu de separare a izomerilor optici, a demonstrat şi intervenţia unei caracteristici fizice, ca disimetria moleculară, în fenomenele chimice ale vieţii dar, mai ales, a atras atenţia lui Pasteur asupra unui fenomen spre care se va îndrepta în continuare curiozitatea lui de cercetător : microorganismele produc transformări ale substanţelor organice printr-o activitate fiziologică selectivă, foarte specifică.

Cercetările lui Pasteur asupra fermentaţiilor normale şi deviate ale vinului şi berii l-au condus la următoarele concluzii fundamentale : 1) fermentaţiile sînt procese biologice determinate de acţiunea unor microorganisme anaerobe, deci *fermentaţia este viaţa fără aer* ; 2) fiecare tip de fermentaţie este produs de un anumit microorganism, care este specific în sensul că determină o anumită transformare a mediului pe care creşte ; 3) dezvoltarea unui microorganism străin în mediul unde acţionează un microorganism cu acţiune fermentativă specifică deviază cursul normal al fermentaţiei în dauna calităţii (prin apariţia de compuşi noi, nedoriţi) şi a randamentului ei în produs util, determinînd o aşa-numită „boală" a fermentaţiei ; 4) microorganismele străine care produc „bolile" vinului

și ale berii sînt consecința contaminărilor din aer, de pe vasele sau din ingredientele folosite în producție, iar multiplicarea lor poate fi prevenită prin încălzire, prin procedeul utilizat sub denumirea de *pasteurizare*.

Controversele asupra generației spontane

Descoperirea microorganismelor a mărit interesul pentru problema originii organismelor vii, asupra căreia se înfruntau două concepții diametral opuse:

— *Teoria generației spontane*, conform căreia organismele actuale (chiar plantele și animalele) pot lua naștere din materia lipsită de viață, a fost acceptată fără rezerve pînă la sfîrșitul Renașterii cînd a fost parțial abandonată. Astfel, Aristotel (384—322 î.e.n.) considera că animalele pot apărea spontan din sol, plante sau animale diferite, iar Vergilius (70—19 î.e.n.) dădea sfaturi privind înmulțirea artificială a albinelor.

— Cea de-a doua teorie — acceptată și de Leeuwenhoek — consideră că „animalculele"actuale se formează din „germeni" sau „semințe" ale acestora prezente în aer.

În secolul al XVIII-lea, în timp ce studiul plantelor și al animalelor aducea dovezi fără echivoc împotriva teoriei generației spontane, primele cercetări efectuate pe microorganisme ofereau, dimpotrivă, argumente favorabile. În plus, în perioada anilor 1748—1750, Buffon și Needham publicau în colaborare lucrări în care proclamau că „*vitalitatea este o proprietate indestructibilă a materiei vii*" și că moleculele inerte care compun ființele vii se pot reagrega singure, pentru a forma organisme microscopice. Ei nu considerau că microorganismele se nasc „spontan", ci că provin din transformarea substanțelor organice preexistente (*teoria heterogeniei*).

Spallanzani (1729—1799) demonstrează, printr-o gamă largă de experiențe, că încălzirea la fierbere împiedică apariția microorganismelor în infuziile nutritive, unde sînt aduse din aer. „Aerul este esențial pentru apariția „spontană" a microorganismelor", deoarece o infuzie rămîne permanent sterilă dacă este închisă ermetic într-un flacon și fiartă.

Ignorarea, pe atunci, a unor principii esențiale, care mai tîrziu au stat la baza microbiologiei experimentale, în special în ceea ce privește sterilizarea și asepsia, au făcut posibilă concluzia falsă că microorganismele pot lua naștere prin organizarea spontană a substanțelor organice din produsele supuse fermentației sau putrefacției. Folosind baloane speciale — baloane cu „gît de lebădă" — Pasteur demonstrează că un mediu de cultură sterilizat, în speță bulionul de carne, poate rămîne steril timp indefinit, dacă se evită contaminarea lui cu germeni din aer. Într-adevăr, dacă prin înclinarea unui asemenea balon, mediul „spală" porțiunile incurbate ale gîtului rămas descoperit, porțiuni în care s-au sedimentat bacterii din aer, bulionul se infectează ca și atunci cînd în mediul dintr-un balon obișnuit, cu gîtul drept, se introduce dopul de bumbac cu care fusese astupată gura balonului și care a reținut bacteriile din aer. Faptul că în baloanele cu mediu steril închise ermetic nu apar niciodată microorganisme, în timp ce același mediu se infectează dacă este lăsat în contact cu aerul, dovedește că microorganismele nu iau naștere spontan din materia organică inanimată, ci numai se înmulțesc în ea, pornind de la organisme similare provenite din mediul înconjurător.

Experienţele lui Pasteur se referă bineînţeles la *originea actuală* a microorganismelor într-un mediu de cultură sau o infuzie, iar demonstraţia imposibilităţii generaţiei spontane este valabilă strict la anumite limite temporale, corespunzînd fazei actuale din istoria Pămîntului.

Teoria originii microbiene a bolilor infecţioase Originile bacteriologiei medicale

Bolile infecţioase au suscitat un interes deosebit din cele mai vechi timpuri, datorită gravităţii lor şi modului de propagare, care determină un mare număr de victime în comunităţile umane sau printre animale. Ideea curentă în primele orînduiri sociale că asemenea boli sînt manifestări ale mîniei divine şi, ca atare, se pot vindeca numai prin conjurarea acesteia cu ajutorul jertfelor şi rugăciunilor a fost treptat abandonată şi s-a trecut la încercări de explicare ştiinţifică, bazate pe observaţii şi interpretări realiste, desigur în limitele cunoştinţelor existente în epoca respectivă. Hipocrat (400 î.e.n.), întemeietorul medicinii, ia în considerare în geneza acestor boli participarea a doi factori : unul intrinsec, reprezentat de constituţia bolnavului, şi altul extrinsec, constînd dintr-o alterare de natură necunoscută a aerului, care devine prin el însuşi nociv. Această primă ipoteză asupra etiologiei bolilor infecţioase a persistat multă vreme sub forma *teoriei miasmelor* (gr. *miasma* = emanaţie putridă, murdărie). Într-o variantă mai concretă ea a fost formulată de Varon (100 î.e.n.), care considera că alterarea aerului (de aici şi termenul *malaria* = aer rău) este determinată de animale foarte mici, invizibile, care pătrund în organism prin gură şi prin nări.

Prima încercare de înlăturare a acestei concepţii, devenită nesatisfăcătoare, se datoreşte lui Fracastor (1488—1553), care a intuit foarte corect una dintre caracteristicile esenţiale ale bolilor produse de microorganisme, şi anume contagiozitatea lor. În lucrarea sa „De contagionibus et contagiosis morbis et eorum curatione" (1566) arată că „infecţia este aceeaşi pentru cel care a primit-o şi pentru cel care a dat-o" şi că ea este produsă de „particule mici şi imperceptibile" („seminaria morbi"), care trec de la un animal bolnav la altul sănătos. Fiind pur ipotetică, această concepţie nu s-a putut impune, astfel că legătura dintre boală şi un agent patogen microbian nu s-a mai făcut pînă în epoca pasteuriană, cînd a fost dovedită experimental.

Descoperirea microorganismelor de către Leeuwenhoek a dus la o nouă concepţie după care bolile epidemice erau produse de paraziţi (*teoria germenilor* sau *contagium animatum*). Prima confirmare experimentală a acestei concepţii a adus-o Agostino Bassi (1773—1856), care a demonstrat (1837) că *muscardina*, boală epidemică a viermelui de mătase, este produsă de o ciupercă *Botrytis bassiana*.

Cu toate acestea, înainte de perioada pasteuriană, ideea participării microorganismelor la determinarea unor boli era respinsă ca nefiind probată pe cale experimentală. Virchow considera bolile ca rezultatul unor activităţi celulare anormale, iar Claude Bernard atribuia rolul de factori patogeni unor fermenţi eliberaţi chiar în organism sub acţiunea unei catalize misterioase. Pasteur extinde noţiunea de *specificitate* din domeniul fermentaţiilor în acela al patologiei omului şi animalelor, în

sensul că orice boală infecţioasă este rezultatul activităţii vitale a unui anumit microorganism specific, care se dezvoltă ca parazit în organismul animal respectiv.

Cercetările lui Pasteur consacrate viermilor de mătase (1865—1870) au dus la identificarea a două boli contagioase, *pebrina* şi *flaşeria*, la stabilirea modului lor de transmitere şi a particularităţilor de evoluţie în diferitele stadii de evoluţie ale gazdei, precum şi la stabilirea unor mijloace eficace de prevenire. Concluziile acestor studii nu numai că au rezolvat problemele grave care afectau sericicultura ţării sale, dar au scos în evidenţă importanţa cercetării experimentale a microorganismelor în microbiologie şi patologie.

Descoperirea bacteridei carbonoase în sîngele animalelor moarte din cărbune (Rayer şi Davaine, 1850) nu a eliminat disputele dintre partizanii şi adversarii *teoriei germenilor*, care considerau fie că *B. anthracis* era consecinţa şi nu cauza bolii, fie că nu este un organism viu, ci fibrile de fibrină. Disputa este clarificată de Koch (1843—1910) care demonstrează fără echivoc că bacteridia carbonoasă este agentul patogen al bolii, pe care îl cultivă *in vitro* în ser sanguin, studiind formarea de spori termorezistenţi, alternanţa de sporulare şi germinare şi caracterul specific al acţiunii sale patogene, deosebit de al altor bacterii (1876), precum şi faptul că infecţia naturală a animalelor provine din sol, prin iarba contaminată.

Pe baza acestor cercetări, Koch stabileşte criteriile indispensabile pentru ca un microorganism izolat dintr-un organism afectat de o anumită boală să poată fi considerat în mod justificat ca agentul cauzal al bolii respective. Aceste criterii, cunoscute sub numele de *postulatele lui Koch*, reprezentînd o dezvoltare şi o transpunere în termeni concreţi a noţiunii pasteuriene de specificitate a activităţii patogene microbiene, sînt următoarele: 1) microorganismul incriminat să poată fi întotdeauna pus în evidenţă în toate cazurile bolii respective, iar distribuţia lui să corespundă leziunilor caracteristice bolii; 2) să poată fi izolat în cultură pură pe medii artificiale şi 3) după ce este cultivat *in vitro* mai multe generaţii, să reproducă boala şi leziunile specifice la animalele sensibile, de la care să poată fi reizolat. Rămase valabile pînă astăzi, în spiritul, dacă nu totdeauna în litera lor, *postulatele lui Koch* au reprezentat şi reprezintă încă un principiu eficace de lucru, a cărui respectare previne interpretările eronate în materie de diagnostic bacteriologic sau de identificare a unor noi agenţi patogeni infecţioşi. Aplicarea acestor principii i-au permis lui Koch şi elevilor săi să identifice în anii următori agenţii patogeni ai principalelor boli infecţioase.

Koch a adus în dezvoltarea microbiologiei ca ştiinţă contribuţii de ordin tehnic şi teoretic valoroase, între care conceptul de „cultură pură", respectiv de organism cultivat într-un mediu lipsit de alte organisme*). Obţinute iniţial de Lister (1878) prin diluţii succesive în serie în medii lichide, pînă cînd un singur microorganism este repartizat într-un recipient cu mediu steril, realizarea culturilor pure este facilitată prin introducerea, în tehnica microbiologică, a mediilor de cultură solidificate (cu gelatină

*) Brock consideră mai corectă denumirea de „cultură axenică", deoarece termenul de „cultură pură" este echivoc, implicînd sensul de puritate genetică.

sau agar) dacă suspensia folosită pentru însămînţare este suficient de diluată. Cum o colonie microbiană reprezintă de obicei descendenţa unei singure celule parentale, însămînţarea ei ulterioară într-un mediu steril generează o cultură de celule din aceeaşi specie sau tulpină. Descoperirea acestei posibilităţi de a obţine culturi pure a constituit un progres care a stat la baza microbiologiei moderne, deoarece a oferit un mijloc simplu şi sigur de izolare a bacteriilor, în vederea studierii particularităţilor lor de specie, a biologiei lor, a identificării şi încadrării lor sistematice.

Deşi în studiul unor procese naturale care se desfăşoară în rumen, tractul intestinal, în sol, în lacuri sau în mediul marin, ca şi în unele procese industriale sîntem mai interesaţi de activitatea şi interrelaţiile unor populaţii mixte de microorganisme, cultura pură îşi păstrează importanţa fundamentală pentru studiile de microbiologie.

Pasteur a confirmat rezultatele lui Koch asupra cărbunelui, izolînd şi cultivînd agentul patogen de la animalele bolnave şi din solurile în care au fost îngropate cadavrele acestora, implicînd rîmele în vehicularea sporilor la suprafaţa solului şi răspîndirea bolii.

Atras tot mai mult de bolile omului, Pasteur demonstrează rolul bacililor anaerobi în gangrena gazoasă, al cocilor în furuncule, abcese, osteomielită şi în febra puerperală, aducînd probele finale pentru *teoria germenilor* în apariţia bolilor infecţioase.

Pentru denumirea organismelor microscopice Pasteur a adoptat termenul de „microb'', creat, cu asentimentul lui Littré, de către medicul francez Sédillot (1878), termen dealtfel incorect, deoarece sensul său este „viaţă scurtă'' şi nu „dimensiuni mici''. Această denumire, nefolosită în prezent în limbajul ştiinţific, s-a păstrat, astfel că noua ştiinţă, avînd ca obiect studiul microorganismelor, a rămas cu numele de microbiologie.

Denumirea de bacterie a fost introdusă de Ehrenberg (1838) care a descris şi individualizat 41 specii de microorganisme, creînd denumiri de gen folosite şi astăzi (*Bacterium, Spirillum, Spirochaeta*), fără ca să stabilească o deosebire de natură între protozoare şi bacterii.

Apariţia şi dezvoltarea imunologiei

Una dintre consecinţele descoperirii şi izolării agenţilor patogeni ai bolilor infecţioase de către Pasteur şi Koch a fost apariţia unei ştiinţe noi — *imunologia*.

Studiind holera găinilor, Pasteur observă că agentul patogen îşi pierde complet, prin învechirea culturii, capacitatea specifică de a produce această boală, adică devine avirulent. Inoculată la păsări sănătoase, cultura avirulentă le conferă acestora rezistenţa faţă de holeră, în sensul că ele nu se mai îmbolnăvesc nici dacă sînt infectate cu o cultură proaspătă, virulentă; păsările „vaccinate'' au devenit „imune'' în urma contactului lor prealabil cu agentul patogen specific lipsit de virulenţă. Prin această descoperire, Pasteur pune bazele ştiinţifice ale vaccinării care au permis

extinderea ei ca procedeu de prevenire a infecţiilor*). Pe acelaşi principiu — a cărui descoperire i-a sugerat şi ideea foarte fecundă a *variabilităţii microorganismelor* sub acţiunea unor condiţii de mediu nefavorabile — Pasteur a mai preparat şi utilizat cu succes *vaccinul anticărbunos* (1881), apoi *vaccinul antirabic* (1885), fapt deosebit de important din punct de vedere practic în ceea ce priveşte acesta din urmă, deoarece virusul care produce turbarea, boală pînă atunci ineluctabil mortală, nu putuse fi pus în evidenţă de Pasteur din cauza insuficienţei mijloacelor tehnice din acea vreme.

Metchnikoff (1845—1916), studiind digestia intracelulară la echinoderme, demonstrează capacitatea anumitor celule din cavitatea lor generală de a capta şi îngloba diferitele particule cu care vin în contact şi emite ipoteza că celule cu funcţie asemănătoare — denumite de el „fagocite" — ar putea exista şi în organismul altor animale, cărora le-ar determina rezistenţă faţă de infecţie prin încorporarea şi digestia intracelulară a microorganismelor patogene pătrunse în mediul intern. Ulterior (1884), studiind infecţia crustaceului *Daphnia magna* cu ciuperca *Metschnikowia (Monospora) bicuspidata*, observă că sporii aciculari ai levurii pătrund odată cu hrana în tubul digestiv al dafniei de unde, străbătînd peretele acestuia, trec în cavitatea generală unde sînt atacaţi de celule mobile care se deplasează prin mişcări amoeboide, numite de el *amoebocite*. În cazul cînd infecţia este moderată, amoebocitele înglobează şi digeră toţi sporii ciupercii şi astfel crustaceul supravieţuieşte. Cînd însă infecţia este masivă, sporii rămaşi nefagocitaţi germinează şi dau naştere formei vegetative a ciupercii care, prin multiplicare, invadează tot organismul dafniei, determinîndu-i moartea. Metchnikoff extinde rezultatele acestor observaţii la animalele superioare şi la om, demonstrînd prezenţa şi importanţa celulelor cu proprietăţi fagocitare, în reacţiile de apărare ale organismului faţă de bacteriile patogene, stabilind astfel bazele *imunităţii celulare*.

Ulterior, Behring şi Kitasato (1890), descoperind seroterapia, demonstrează că organismele superioare dispun, pentru a lupta împotriva agresiunilor bacteriene, în afara imunităţii celulare, de alte mijloace de apărare foarte eficace, reprezentate de imunitatea umorală.

Descoperirea virusurilor

În anul 1892, Ivanovski demonstrează că mozaicul tutunului este produs de un agent patogen invizibil la microscop, care traversează filtrele bacteriologice şi poate fi transmis de la o plantă bolnavă la una sănătoasă prin intermediul filtratului acelular al trituratului de frunze cu leziuni. În 1898, Beijerinck (1851—1895) confirmă filtrabilitatea agentului patogen şi descoperă că poate fi precipitat cu etanol, fără să-şi piardă

---

*) Primul vaccin folosit în practică a fost cel antivariolic, preparat de medicul englez Edward Jenner (1749—1825). În 1796 acesta confirmă — prin eficacitatea inoculării pe cale cutanată la om a unui preparat de „pulpă vaccinală" — observaţia sa, iniţial întîmplătoare, că în urma contactului accidental al tegumentului mîinilor cu pustulele de pe ugerul vacilor bolnave de vaccină se produce o infecţie uşoară, în urma căreia organismul uman capătă o rezistenţă solidă faţă de îmbolnăvirea de variolă, boală foarte gravă şi adesea mortală a omului. Cu toate implicaţiile practice excepţionale ale acestei descoperiri, ea a rămas fără ecou din punct de vedere ştiinţific, fenomenul pe care-l punea în evidenţă, rămas neexplicat, fiind considerat ca particular.

puterea infecţioasă. Este primul cercetător care intuieşte natura deosebită a agentului patogen cunoscut astăzi ca fiind *virusul mozaicului tutunului*, pe care îl consideră ca agent contagios viu, dar corpuscular („Infecţia, scria Beijerinck, nu este produsă de microbi, ci de un principiu infecţios fluid"). Intuiţia genială privind diferenţele dintre natura virusurilor şi a microorganismelor fac din Beijerinck adevăratul întemeietor al *virologiei* ca ştiinţă (Lwoff, 1957).

Dezvoltarea ulterioară a virologiei şi în special perfecţionarea tehnicilor de lucru au permis purificarea virusurilor, determinarea compoziţiei chimice şi a dimensiunilor lor, cultivarea, izolarea şi identificarea diferitelor virusuri patogene pentru plante, animale şi om, inclusiv a unor virusuri producătoare de tumori maligne (Rous, 1911).

Un rol deosebit în evoluţia conceptelor fundamentale din bacteriologie şi virologie l-a avut descoperirea bacteriofagilor de către Twort (1915) şi d'Hérelle (1917), precum şi a fenomenului de lizogenie de către Bordet şi M. Ciucă (1921).

Apariţia altor domenii aplicative ale microbiologiei

Cercetările lui Pasteur şi Koch asupra fermentaţiilor şi bolilor infecţioase au incitat numeroşi microbiologi să studieze rolul microorganismelor în natură şi posibilitatea de a le utiliza în practică. Rînd pe rînd a fost demonstrată răspîndirea lor ubicvitară, participarea specifică în mai multe etape esenţiale ale marilor cicluri naturale ale C, N, S, P etc., adică la procesele prin care constituenţii materiei organice sînt degradaţi şi reintroduşi în circulaţie sub o formă asimilabilă de către alte organisme.

A fost stabilită o corelaţie între fertilitatea solurilor şi activitatea microorganismelor. Winogradski (1856–1953), întemeietorul *microbiologiei solului*, lucrînd la Institutul Pasteur din Paris, a descris procesul de asimilare la organismele chimiosintetizante şi fenomenul de fixare a azotului atmosferic de către microorganisme. În acelaşi timp, el a elaborat metodele speciale pentru cercetarea activităţii microorganismelor din sol.

Un rol de o importanţă deosebită pentru dezvoltarea biochimiei şi a industriei fermentative şi de biosinteză l-a avut apariţia *enzimologiei microbiene*.

Büchner (1897) confirmă rezultatele cercetărilor lui Pasteur asupra fermentaţiilor şi le completează cu date noi. El demonstrează că şi extractul acelular obţinut din celulele drojdiei de bere, după dezintegrarea lor prin sfărîmare cu nisip în mojar, poate produce fermentaţia glucozei la alcool şi CO_2, datorită sistemului enzimatic complex pe care-l conţine, şi care rămîne activ şi după izolarea lui din celulele vii. Ulterior, în 1905, Harden şi Young arată că, în afară de enzimele termolabile cu molecule mari, extractul de drojdie de bere conţine şi un factor termostabil cu moleculă mică, absolut esenţial pentru funcţionarea sistemului enzimatic descris de Büchner. Acest factor este *cozimaza*, care, după cum s-a demonstrat foarte curînd după aceea, este implicată şi în metabolismul ţesuturilor animale. Studiul cozimazei levurilor a permis elucidarea mecanismului oxidării biologice şi a demonstrat că unul şi acelaşi factor este necesar ca un component esenţial al proceselor metabolice fundamentale la microorganisme şi în ţesuturile animale, ceea ce a constituit una dintre

primele demonstraţii ale similitudinii proceselor metabolice de bază la organismele din întreaga natură vie.

Hansen (1842—1909) deschide calea *microbiologiei industriale* moderne, prin utilizarea culturilor pure ca starteri de fermentaţie.

Ehrlich (1854—1915), care a consacrat o bună parte din cercetările sale studiului reacţiilor imunologice ale organismului, este şi creatorul teoriei moderne a *dezinfecţiei* şi *chimioterapiei selective*. Bazat pe concepţia că trebuie să existe anumite substanţe cu activitate selectivă asupra paraziţilor, netoxice sau cu toxicitate slabă pentru celulele organismului gazdă, el sintetizează primele substanţe chimice active în terapia bolilor produse de spirochete şi protozoare. Lucrările sale în acest domeniu au deschis calea spre era substanţelor chimioterapice, care începe odată cu realizarea sintezei sulfamidelor de către Domagk (1935) şi Trefouël.

Fleming (1881—1955) deschide prin lucrările lui era antibioticelor, de o importanţă excepţională în medicină şi biologie. În 1929 el observă că unele culturi ale mucegaiului *Penicillium* elaborează o substanţă cu proprietăţi antimicrobiene specifice — *penicilina*. Acest prim antibiotic cunoscut a fost mai tîrziu purificat de Florey şi Chain (1940), care au oferit astfel terapeuticii antiinfecţioase un produs cristalizat, stabil, atoxic pentru om şi animal, activ şi *in vivo* asupra unor anumite specii de microorganisme. În 1939, Dubos elaborează o tehnică generală care permite cercetarea sistematică a capacităţii de producere a antibioticelor la microorganismele saprofite. În 1944, Waksman descoperă *streptomicina*, antibiotic elaborat de unele specii de actinomicete, şi deschide prin cercetările sale calea pentru obţinerea din natură a numeroase antibiotice noi.

Apariţia geneticii microorganismelor

Genetica a apărut şi s-a dezvoltat utilizînd ca material de studiu în exclusivitate plantele şi animalele superioare, la care în special variaţiile morfologice şi caracterul lor ereditar sînt foarte evidente. După stabilirea legilor fundamentale ale geneticii formale (Mendel, 1865 şi Morgan, 1911, 1919), în timp ce genetica organismelor superioare a cunoscut o dezvoltare considerabilă (1900—1940), atît geneticienii, cît şi microbiologii erau de acord că conceptele şi metodele geneticii nu se pot aplica microorganismelor în general şi bacteriilor în special. Primele observaţii privind variabilitatea la microorganisme (Beijerinck, 1900) arătau că la *B. prodigiosus* coloniile colorate roşu viu îşi pot pierde culoarea în cursul trecerilor succesive pe medii de cultură sau că *E. coli* îşi poate pierde în acelaşi fel capacitatea de a fermenta lactoza (Massini, 1907).

Dodell (1912) a demonstrat natura ereditară a unor „modificări permanente, care se produc la un microorganism şi care apoi se transmit la generaţiile următoare", dar interpretările date acestor fapte erau foarte diferite şi cel mai adesea confuze.

Ideea că bacteriile nu au nucleu, că sînt lipsite de procese de sexualitate şi că cele mai multe variaţii bacteriene se pot explica prin fenomene pur fenotipice care constau în adaptări induse de mediu sau ca simple „stadii evolutive" în dezvoltarea lor au reprezentat tot atîtea frîne în utilizarea lor ca model experimental în studiul de genetică.

Studiile de genetică a microorganismelor începute cu analiza recombinării sexuate la *Neurospora* (Dodge, 1935) şi la levuri (Winge, 1935) s-au dezvoltat odată cu studiul mutantelor „biochimice" la *Neurospora crassa*, la care Beadle şi Tatum (1941) au demonstrat că incapacitatea de a sintetiza anumiţi metaboliţi esenţiali este controlată de un determinant genetic distinct şi că formarea proteinelor enzimatice este controlată de gene specifice (conceptul o genă — o enzimă).

Demonstrarea caracterului spontan al mutaţiilor bacteriene de către Luria şi Delbruck (1943) prin testul fluctuaţiei şi prezenţa variaţiilor ereditare la bacteriofagi consecutive mutaţiilor au demonstrat identitatea poceselor fundamentale, începînd de la virusuri pînă la organismele superioare.

Etapa biologiei moleculare

Debutul biologiei moleculare*) este marcat de demonstrarea faptului că ADN este substratul material al eredităţii (Avery, Mac Leod şi Mc Carthy, 1944) prin studiile referitoare la procesul de *transformare genetică* a pneumococilor descris de Griffith (1928).

În perioada 1950—1965, influenţa microbiologiei asupra dezvoltării ştiinţelor biologice, în general, este de nedespărţit de transformarea profundă reprezentată de apariţia biologiei moleculare, rezultată din convergenţa mai multor discipline (virologia şi microbiologia, biochimia şi genetica, biofizica, fiziologia celulară), care şi-au propus explicarea proprietăţilor şi performanţelor organismelor vii, a fenomenelor care le caracterizează, în funcţie de structura şi interrelaţiile funcţionale dintre constituenţii macromoleculari care le compun şi de legi care guvernează sistemele mai simple, fizice şi chimice. Microbiologia a avut un rol esenţial, unificator, prin furnizarea modelului experimental unic, reprezentat de bacteria *E. coli* (organismul cel mai bine cunoscut în prezent la nivel molecular) ca prototip al organizării structurale şi funcţionale cele mai simple a sistemelor biologice şi al relaţiilor acestora cu virusurile din categoria bacteriofagilor care le parazitează cu efect letal sau în cadrul unor relaţii de toleranţă reciprocă.

Au urmat o serie de descoperiri fundamentale referitoare la elucidarea structurii macromoleculelor biologice — acizi nucleici şi proteine, a replicării acizilor nucleici şi a circulaţiei informaţiei genetice în celulă, descifrarea mecanismului biosintezei proteinelor şi a codului genetic, determinarea mecanismelor reglării genetice, care dirijează expresia fenotipică a potenţialului ereditar al microorganismelor în funcţie de nevoile lor, elucidarea fenomenelor de transfer de material genetic şi de recombinare genetică la microorganisme, a procesului de mutageneză, explicarea fenomenelor de specificitate ale organismelor, a structurii lor intime şi moleculare, precum şi a proceselor de creştere şi reproducere etc. Descoperirea plasmidelor şi a enzimelor de restricţie a permis punerea la punct a tehnicilor de *inginerie genetică (tehnologii de ADN recombinant)* cu aplicaţii practice, care anunţă o nouă revoluţie în biologie, *revoluţia biotehnologică* sau bioindustrială.

---

*) Denumirea de „biologie moleculară" a fost folosită pentru prima dată de Astbury (1950).

În ultimii ani, microbiologia a dus la descoperiri deosebit de importante în biologia celulei eucariote ca, de exemplu : dezvoltarea metodologiei pentru clonarea ADN, esențială pentru studiul structurii și comportării genelor virale și eucariote, un nou concept asupra genei, mult mai plastic și mai adaptabil decît era considerat înainte, descoperirea unui nou mecanism evolutiv, ca „înnădirea" ARN, transcris după genomul virusurilor animale și al celulelor eucariote, elucidarea mecanismelor moleculare ale transformării maligne induse de virusuri, clarificarea rolului unităților genelor în carcinogeneza chimică etc. (Dulbecco, 1979).

Contribuția cercetătorilor români la dezvoltarea științelor microbiologice

Victor Babeș (1854—1926), fondatorul microbiologiei românești (fig. 4), a dus o prodigioasă activitate de cercetător, studiind numeroase boli ale omului, printre care lepra, tuberculoza, holera, febra tifoidă și



Fig. 4. — Victor Babeș (1854—1926).

mai ales turbarea. El a descoperit în sistemul nervos al animalelor moarte de turbare corpusculii Babeș-Negri, datorită cărora se poate stabili retrospectiv diagnosticul acestei infecții. În colaborare cu Cornil, el este autorul primei mari lucrări de sinteză de bacteriologie și anatomie patologică din lume, apărută în 1885 „Bacteriile și rolul lor în etiologia, anatomia și histologia patologică a bolilor infecțioase". În tehnica bacteriologică, Babeș a

introdus procedeul de colorare vitală, care permite cercetarea structurii celulare bacteriene nealterate de artefacte. A studiat, de asemenea, asociaţiile microbiene, fiind primul cercetător care — după Pasteur — şi-a dat seama de importanţa pentru terapeutică a antagonismului microbian şi a substanţelor antibiotice.

Ioan Cantacuzino (1863—1934) este creatorul Institutului de microbiologie care îi poartă numele şi al şcolii contemporane de microbiologie din ţara noatră (fig. 5). Din bogata sa contribuţie ştiinţifică originală, cele

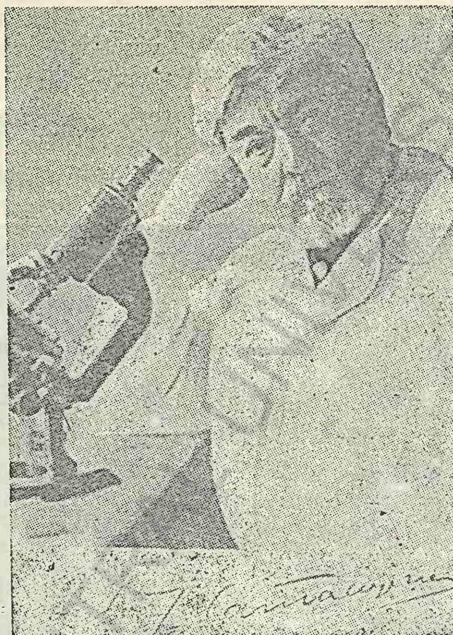


Fig. 5. — Ioan Cantacuzino (1863—1934).

mai importante lucrări sînt referitoare la aparatele şi funcţiile fagocitare în regnul animal (1896) şi la problema imunităţii la nevertebrate (1923). În aceste lucrări, el dă o interpretare fiziologică modernă fenomenelor de apărare a organismului faţă de agenţii patogeni. Cantacuzino a studiat, de asemenea, diferite boli ca holera, febra tifoidă, scarlatina, tuberculoza etc., creînd şi organizînd condiţiile producţiei de seruri şi vaccinuri în ţara noastră, ceea ce a contribuit la combaterea multor boli infecţioase grave.

Şcoala contemporană de microbiologie din ţara noastră a fost ilustrată de savanţi de reputaţie internaţională.

Constantin Ionescu-Mihăeşti (1883—1962), elevul şi colaboratorul cel mai apropiat al prof. Cantacuzino, a adus un aport de importanţă excepţională la organizarea şi dezvoltarea Institutului dr. I. Cantacuzino şi la formarea cadrelor actuale de microbiologi din ţara noastră. Contribuţia sa ştiinţifică deosebit de valoroasă s-a manifestat în domeniul imunologiei, virologiei şi microbiologiei generale (studiul metabolismului şi

al imunochimiei bacilului tuberculozei, studii asupra poliomielitei, holerei, antraxului, tifosului exantematic etc.).

Dumitru Combiescu (1887—1961) a desfăşurat o amplă activitate de cercetare ştiinţifică originală în probleme complexe ca: variabilitatea microorganismelor sub influenţa mediului de cultură, imunitatea şi infecţia în antrax etc. Activitatea cea mai însemnată a lui este în domeniul rickettsiozelor şi zoonozelor (tifosul exantematic, febra Q, leptospirozele) al căror studiu complex, legat de condiţiile din ţara noastră, l-a preocupat îndeaproape şi în care a adus contribuţii originale aplicate în combaterea acestor boli. Maestru neegalat, Combiescu, s-a dăruit cu pasiune formării cadrelor de microbiologi şi epidemiologi, pe care le-a îndrumat şi le-a ţinut aproape de preocupările ştiinţifice în tot timpul vieţii sale.

Mihai Ciucă (1883—1969), autorul unor lucrări deosebit de importante în domeniul bacteriofagului, paludismului, salmonelozelor, difteriei, a avut un rol esenţial în organizarea campaniei de eradicare a malariei în ţara noastră. Cercetările sale în numeroase probleme speciale ca: fenomenul de lizogenie, infecţiile stafilococice, variabilitatea microbiană şi infecţiile de spital, cercetări conduse cu o metodă sigură şi aplicate cu o deosebită eficienţă în practică, au înscris numele acad. M. Ciucă între cercetătorii care au adus contribuţii de seamă la progresul ştiinţelor microbiologice.

Ştefan S. Nicolau (1896—1967), creatorul şcolii româneşti de virologie şi fondatorul institutului respectiv, pe lîngă numeroase lucrări originale în domeniul herpesului, turbării, febrei aftoase, febrei galbene, hepatitelor virotice, oncogeneza virală a adus contribuţii fundamentale în probleme de ordin general ca: propagarea virusurilor neurotrope în organismul animal (septinevrita), variabilitatea virusurilor, imunitatea în viroze, geneza incluziunilor virale etc.

Un rol cu totul deosebit în dezvoltarea ştiinţelor microbiologice în ţara noastră l-a avut Institutul dr. I. Cantacuzino, care sub conducerea profesorilor C. Ionescu-Mihăeşti, Mihai şi Al. Ciucă şi D. Combiescu a cunoscut o perioadă de dezvoltare cu totul excepţională prin activitatea legată de cercetările fundamentale de microbiologie, virologie, imunochimie, parazitologie, imunologie şi genetică bacteriană şi virală, producerea de seruri şi vaccinuri antibacteriene şi antivirale, la care s-a adăugat activitatea epidemiologică de teren, în lupta pentru combaterea şi eradicarea unor boli. Consacrîndu-şi activitatea cercetării ştiinţifice, producţiei de seruri, vaccinuri şi produse biologice şi învăţămîntului de specialitate, Institutul dr. I. Cantacuzino a reprezentat nu numai o şcoală neegalată la care s-au format cei mai buni specialişti din ţara noastră, dar, în acelaşi timp, şi un focar de cultură, „un aşezămînt trainic, indiferent la seisme, de o sănătate morală incomparabilă".

[illegible]

Mihai Ciucă (1883—[illegible]) [illegible] de importanță în domeniul bacteriologiei, parazitologiei, [illegible], diferite, a avut un rol esențial [illegible] de [illegible] a malariei în țara noastră. [illegible] probleme speciale ca: [illegible] microbiană și infecția de spital, [illegible] și aplicate cu o deosebită eficiență [illegible]. Ciucă între cercetătorii care [illegible] microbiologice.

Ștefan S. Nicolau (1896—[illegible]) [illegible] de virologie și fondatorul [illegible] lucrări originale [illegible], febrei galbene, [illegible] în problema [illegible] etc.

Un rol [illegible] microbiologiei în țara noastră l-a avut [illegible] profesorilor C. Ionescu-Mihăiești, M. Ciucă și D. Combiescu a [illegible] activitatea legată de cercetările fundamentale de microbiologie, virologie, imunochimie, parazitologie, imunologie și genetică bacteriană [illegible] producerea de seruri și vaccinuri [illegible] de o [illegible] morală incomparabilă".

VIROLOGIE GENERALĂ

Introducere

Primele date referitoare la natura și caracterele specifice ale unor boli virale sînt foarte vechi, fiind consemnate pentru variola umană în China antică, din anul 2500 î.e.n., iar pentru rabie în lucrările lui Aristotel și Cornelius Celsus. Bolile virale ale plantelor au fost cunoscute, de asemenea, cu mult înainte de descoperirea agenților lor patogeni, Crave (1720) demonstrînd posibilitatea transmiterii mozaicului panașat al lalelelor prin grefă la o plantă sănătoasă. Anul 1796 marchează momentul primelor vaccinări antivariolice efectuate de Jenner.

Pasteur, în perioada anilor 1881—1885, demonstrează infecțiozitatea sistemului nervos la animale moarte de turbare și descoperă vaccinul antirabic. În fața imposibilității de a evidenția și izola un agent patogen specific, el admite existența unui microb al turbării, deși nu l-a putut decela, probabil din cauza dimensiunilor mici care îl făceau invizibil cu ajutorul mijloacelor optice ale timpului. Mayer (1886) demonstrează posibilitatea de transmitere a mozaicului tutunului prin frecare la plante sănătoase și inactivarea principiului infecțios, considerat ca un „ferment organizat", prin tratare cu alcool sau prin încălzire la 80°C. Ivanovski (1892) confirmă infecțiozitatea sucului extras din plantele de tutun bolnave de mozaic, demonstrînd multiplicarea agentului patogen în plantele bolnave la care este transmis în serie. Bazat pe aceasta și pe faptul că agentul infecțios trece prin filtrele care rețin bacteriile, îl consideră un agent viu, filtrabil, de tipul bacteriilor foarte mici. Beijerinck (1898) confirmă multiplicarea și transmisibilitatea în serie a agentului patogen, rezistența îndelungată (2 ani) în frunzele uscate și difuzibilitatea în agar. El ajunge la concluzia că virusurile nu sînt microorganisme, nici toxine, ci o substanță specială solubilă, moleculară *(contagium vivum fluidum)*, capabilă să se multiplice în celula vie dacă este încorporată în citoplasma acesteia. Aceste date, reconsiderate în ultimii ani, au dus la concluzia că virusurile au fost descoperite de Beijerinck, primul cercetător care a intuit natura lor deosebită de ceilalți agenți patogeni.

După descoperirea bacteriofagilor de către Twort (1915) și D'Hérelle (1917), Müller (1921) afirmă existența unor similarități între fagi și gene. Duggar și Armstrong (1923) consideră virusul mozaicului tutunului (VMT) ca „o particulă de cromatină sau o altă structură cu ereditate definită care ar putea fi o genă revoltată împotriva lanțurilor de coordonare".

Cunoștințele asupra virusurilor se îmbogățesc odată cu perfecționarea tehnicilor de izolare, purificare și studiere care permite într-un timp foarte

scurt demonstrarea naturii nucleoproteinice a fagilor (Schlessinger, 1936), a naturii (ARN) materialului genetic al VMT (Bawden şi Pirie, 1937), evidenţierea VMT prin microlectronografie (Kausche, Pfrankuch şi Ruszka, 1939) etc.

Ulterior, Cohen (1946) a dovedit că energia necesară pentru sinteza constituenţilor virali este furnizată de celula-gazdă, iar Hershey şi Chase, (1952) utilizînd modelul fag-bacterie, au demonstrat că numai ADN fagic pătrunde în celula-gazdă, replicarea fagului fiind efectuată de celula-gazdă, pornind numai de la materialul genetic al acestuia.

Prima încercare de sinteză a cunoştinţelor acumulate a fost făcută de Lwoff (1953), care a dat denumirea de *virion* particulei virale mature, a introdus terminologia ştiinţifică a componenţilor acestuia şi a definit principalele particularităţi ale virusurilor, ceea ce a permis delimitarea lumii virusurilor şi diferenţierea ei de microorganisme, în general, şi de unele bacterii patogene (*Rickettsia*), considerate ca intermediare între virusuri şi bacterii, în special.

Conceptul de virus

Virusurile reprezintă o categorie specifică de agenţi infecţioşi, structural şi fiziologic fundamental diferiţi de oricare dintre microorganismele cunoscute. Din cauza dificultăţilor de observare, cultivare şi studiere, foarte multă vreme au fost considerate prin prisma unor caractere evidente (filtrabilitate, dimensiuni foarte mici, parazitism obligat intracelular, inactivare prin căldură etc.), care s-au dovedit a nu fi definitorii, şi în consecinţă nediscriminatorii, în raport cu alţi agenţi infecţioşi şi în special cu bacteriile. Aceasta explică încadrarea absurdă (Lwoff, 1981), dar timp îndelungat, a bacteriilor mici, filtrabile, ca ,,intermediari'' între bacteriile adevărate şi virusuri.

Recunoaşterea ştiinţifică a virusurilor ca entităţi particulare se datorează lui Lwoff (1953, 1981), care, pentru a defini conceptul de virus, a încercat să stabilească ansamblul caracterelor originale care conferă lumii virusurilor personalitatea şi realitatea acesteia, permiţînd deosebirea între virus şi ,,non-virus''. Aceste date au dus la concluzia că virusurile aparţin unui grup de agenţi infecţioşi, reuniţi într-o categorie unică, datorită faptului că posedă, în comun, un număr important de trăsături specifice sau caractere discriminatorii*) (marcînd diferenţe absolute), corelative şi subordonate, care sînt absente la toate entităţile apartenente altor categorii (tabelul nr. 1).

Din datele înscrise în tabel rezultă cîteva particularităţi cu totul aparte ale virusurilor :

— Sînt agenţi infecţioşi de tip special, iar infecţia virală este rezultatul introducerii în celulă sau în organism a materialului genetic viral, ceea ce le deosebeşte esenţial de bacteriile patogene ; anumite faze ale ciclului evolutiv al unui virus nu sînt patogene, iar altele nu sînt infecţioase (în cazul fagilor virulenţi, virionul este infecţios şi patogen, faza vegetativă

---

*) Pentru a evidenţia necesitatea definirii unei categorii specifice de entităţi prin posedarea în comun a unui număr important de caractere discriminatorii, Lwoff (1981) citează cazul complexului dehidrogenazei piruvice a mamiferelor care, fiind asociată cu o dehidrolipoiltransacetilază şi o dehidrolipoildehidrogenază, apare la microscopul electronic — ca şi unele virusuri — cu simetrie icozaedrică. În fiecare icozaedru se găsesc 60 de lanţuri polipeptidice de transacetilază. Aceasta demonstrează că genele celulelor animale pot purta informaţia genetică necesară pentru construcţia unui icozaedru, care nu are nici o legătură cu virusurile organizate pe baza acestui tip de simetrie. Complexul enzimatic este metabolic activ, în timp ce capsida este inertă.

Tabelul nr. 1

Caracterele discriminatorii ale virusurilor și bacteriilor

		VIRUS	BACTERIE
Tipul de organizare		Acelular	Celular
Unitatea de structură și funcție		Virionul	Celula bacteriană
Stările posibile de existență		*Virion* — virus infecțios matur (particulă virală completă) *Virus vegetativ* — genom viral liber intracelular, care poate fi replicat *Provirus* — genom viral integrat în cromosomul celulei-gazdă	Celula bacteriană (forma vegetativă, capabilă de diviziune) Sporul bacterian (facultativ)
Structura internă		Genom viral + capsidă = nucleocapsidă. Accesoriu, înveliș extern, hemaglutinine	Relativ complexă (structuri esențiale sau accesorii) : peretele celular, membrană plasmatică, citoplasmă, nucleoid, ribosomi, vacuole, incluziuni, spor, aparat fotosintetic, capsulă, strat mucos, flageli, pili, fimbrii, glicocalix
Simetria la nivel molecular		Constantă ; de tip helical, icozaedric sau binară (mixtă)	Absentă
Structura chimică	Acizi nucleici	ADN sau ARN, niciodată ambii ; exclusiv în genomul viral	ADN (în genom) și ARN ca ARNm, ARNt și ARNr (în citoplasmă)
	Proteine	Număr fix de același tip sau aparținînd unui număr mic de tipuri diferite ; rol structural (capsidă), excepțional enzimatic	Număr variabil aparținînd la 2—3 000 de tipuri diferite ; rol structural și enzimatic
	Glucide	Absente ; rareori prezente la unele virusuri*)	Prezente constant
	Lipide	Absente ; rareori prezente la unele virusuri*)	Prezente constant
	Echipament enzimatic de biosinteză și catabolism	Absent**)	Prezent constant
Proprietățile biologice	Producere de energie cu potențial ridicat	Absentă	Prezentă
	Sinteză independentă de constituenți	Absentă	Prezentă
	Capacitate de creștere	Absentă ; număr fix de molecule pentru fiecare tip de virion	Prezentă
	Capacitate de diviziune	Absentă	Prezentă
	Mod de reproducere	Obligator într-o celulă-gazdă vie, pornind exclusiv de la genomul viral (replicare)	Multiplicare independentă, pornind de la ansamblul integrat al constituenților celulari

*) Prezente în învelișul extern al unor virusuri provin, în cea mai mare parte, din celula-gazdă.

**) Uneori prezență de enzime cu rol în replicarea virionului, favorizarea pătrunderii sau eliberării virusului din celula-gazdă, fără posibilitatea de a realiza procese de sinteză sau producere de energie.

Tabelul nr. 1 (continuare)

Utilizarea sistemelor structurale și biochimice ale celulei-gazdă în cursul parazitismului intracelular	Sistem enzimatic Lipmann	Da	Nu
	ARNt	Da	Nu
	Ribosomi	Da	Nu
Parazitism absolut		Constant ; obligat	Absent

este patogenă , dar neinfecțioasă, iar profagul nu este nici infecțios și nici patogen).

— Parazitismul virusurilor marchează o diferență absolută, inexistentă în alte cazuri în natură, și diferită de parazitismul obligat-intracelular caracteristic, de exemplu, unor bacterii (rickettsii) în raport cu diferite celule-gazdă eucariote (rickettsiile găsesc adăpost în mediul pe care îl parazitează, dar își păstrează existența structurală și funcțională, fac biosinteze și cresc ca organisme unicelulare, utilizînd echipament enzimatic propriu și energia produsă cu ajutorul enzimelor proprii și se divid pornind de la ansamblul integrat al constituenților lor celulari).

— Parazitismul virusurilor este condiționat de utilizarea sistemelor enzimatice Lipmann celulare, care asigură conversia energiei potențiale a substanțelor nutritive în energie, de utilizarea „mașinăriei" celulare de transport de H, ca și de utilizarea ribosomilor și a ARNt sintetizat în celula-gazdă.

Aceste caractere corelative definesc *parazitismul absolut* al virusurilor, caracter discriminator față de cel al bacteriilor sau al protistelor (Lwoff, 1981).

În celulele infectate cu virusuri, metabolismul celular suferă modificări esențiale, rezultatul final fiind devierea în sensul producerii de virus nou, progen, ca rezultat al procesului de replicare virală, pornind de la informația nouă, străină, adusă de genomul viral în celula-gazdă. Ca urmare, în celulele infectate cu virusuri procesele de sinteză*) continuă cel puțin o perioadă de timp, deoarece sînt necesare pentru producerea de constituenți virali. Competiția dintre virus și celulă are loc la nivelul diataxiei : în celulele animale, ca și în bacteriile infectate cu virusuri citocide, diataxia celu-

*) Lwoff (1953, 1981) numește *sinteză* producerea metaboliților esențiali (aminoacizi, nucleotide etc.) și *diataxie* (gr.=punere în ordine), organizarea lor în secvențe specifice definite sub control genetic. Cele două procese implică participarea unor sisteme complet diferite.

lară este foarte mult diminuată sau blocată sub acţiunea unor constituenti proteici virali (din structura capsidei sau a învelişului viral), în timp ce diataxia virală rămîne foarte activă şi asigură producerea de virus nou. Replicarea virusurilor este condiţionată de inhibarea diataxiei celulare (producerea de constituenţi proprii celulari). Este probabil că dezvoltarea acestor funcţii inhibitorii a fost unul din factorii determinanţi ai evoluţiei virusurilor (Lwoff, 1981).

Pe baza caracterelor de parazite absolute, potenţial infecţioase şi potenţial patogene, Lwoff (1981) include în categoria virusurilor, pe lîngă virusurile propriu-zise *(Euvirus)*, provirusurile şi viroizii, excluzînd plasmidele şi moleculele de ADN transformant.

Anatomia virusurilor

Descrierea morfologică a virusurilor, ca şi dimensiunile lor se raportează totdeauna la *virion* — particula virală matură — care este o unitate integrată de structură şi funcţie, dotată cu proprietatea de infecţiozitate.

Ca morfologie, virionii pot aparţine următoarelor tipuri principale: forma cilindrică-alungită sau de bastonaş, rigid sau flexibil (virusul mozaicului tutunului, fagii filamentoşi); forma sferică (izometrică) sau sferoidală (virusul gripal, *Adenovirus* etc.); forma paralelipipedică (virusurile din grupul *Pox*, respectiv variola-vaccina); forma de obuz sau de cartuş (*Rhabdovirus*) sau forma de mormoloc, spermatozoid sau cireaşă cu coadă (fagii cu coadă), (fig. 6).

Modelul general de structură. Deşi diferitele virusuri se pot deosebi mult ca formă şi dimensiuni ele sînt construite după principii comune. Virionii sînt alcătuiţi din doi constituenţi esenţiali, definitorii: *genomul viral* şi *capsida*, precum şi un constituent accesoriu, *învelişul extern* (fig. 7).

Genomul viral este reprezentat în mod obişnuit printr-o moleculă de acid nucleic (ADN sau ARN — niciodată ambele), cu greutate moleculară diferită de la un virus la altul, lineară sau circulară, mono- sau bicatenară, aşezată helical, împăturită sau înfăşurată pentru a forma o structură compactă. Genomul viral poartă, în general, informaţia genetică necesară pentru propria sa replicare şi pentru devierea metabolismului celulei-gazdă în sensul sintezei celorlalţi constituenţi virali şi a precursorilor lor. Acizii nucleici virali determină infecţiozitatea virusurilor.

Capsida virală (gr. *Kapsa*=cutie) sau învelişul proteic („shell") al virionului, care acoperă genomul, este alcătuită din unul sau mai multe tipuri de molecule de proteină, aranjate în mod regulat, formînd în ansamblu structuri cu formă cilindrică, sferică (izodiametrică) etc., caracteristice pentru tipul morfologic al virionului respectiv. Capsida are rolul de a proteja materialul genetic de degradarea de către nucleaze, mărind astfel rezistenţa virusului faţă de factorii potenţial dăunători din mediul extern şi infecţiozitatea lui. Ea contribuie la fixarea şi pătrunderea virusului în celule şi la determinarea spectrului de gazde al virusului, prin specificitatea interacţiunii sale cu receptorii de virus complementari prezenţi pe suprafaţa celulelor-gazdă. Capsida conţine determinanţi antigenici, răspunzători de producerea răspunsului imun şi a anticorpilor protectori în organismele animale infectate.

Capsida şi genomul viral formează *nucleocapsida*.

VIRUSURI FĂRĂ ÎNVELIȘ EXTERN

ADN d.c.

Iridoviridae* (Tipula iridescent)

Adenoviridae (Adenovirus uman-2)

Papovaviridae (Papilom Shope)

*Unele au înveliș extern

ARN d.c.

Reoviridae (Reovirus Tip1)

ARN m.c.

Picornaviridae (Poliovirus uman1)

ADN m.c.

Parvoviridae (virus Kilham șobolan)

VIRUSURI CU ÎNVELIȘ EXTERN

ADN d.c.

Poxviridae (Vaccina)

Baculoviridae (Poliedroza nucleară)

Herpes viridae (Herpes simplex)

ARN m.c.

Paramyxoviridae (Rujeolă)

Orthomyxoviridae (Influenza)

Rhabdoviridae (Stomatita veziculară)

Retroviridae (Sarcom Rous)

Arenaviridae (Choriomeningita limfocitară)

Coronaviridae (Bronșita infecțioasă aviară)

Bunyaviridae (Bunyamvera)

Togaviridae (Sindbis)

Fig. 6. — Familiile de virusuri animale (după Matthews, 1979).

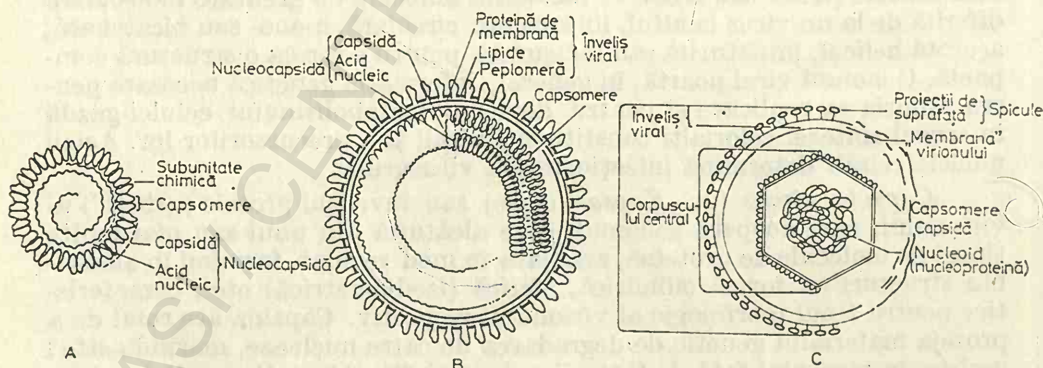


Fig. 7. — Schema structurii virusurilor și denumirile constituenților virali. A. Virion simplu nud, cu capsidă icozaedrică. B. Virion acoperit de înveliș viral cu nucleocapsidă tubulară și simetrie helicală. Învelișul viral este o structură formată dintr-un strat de proteine virale (proteina membranei, alcătuită din subunități structurale), un strat lipidic derivat din lipidele celulare și unul sau mai multe tipuri de subunități morfologice (peplomere, spicule), fiecare formată din una sau mai multe glicoproteine virale. C. Virion icozaedric, format dintr-un corpuscul central alcătuit din proteine asociate direct cu un acid nucleic în interiorul capsidei icozaedrice. Virionul este acoperit de învelișul viral prevăzut cu spicule.

Un nivel mai complex de organizare corespunde virionilor a căror nucleocapsidă este acoperită de o altă structură numită *învelişul extern* sau *peplosul* (gr. *peplos* = manta). Acesta are rolul de a păstra stabilitatea nucleocapsidei şi de a favoriza fixarea virionului pe celulele-gazdă şi, prin aceasta, transmiterea lui mai eficientă, deci infecţia celulei-gazdă.

Virusurile alcătuite numai din nucleocapsidă sînt denumite „nude" sau „neacoperite", spre deosebire de cele cu înveliş extern, care sînt numite „acoperite".

Particularităţile de structură ale constituenţilor virali

Genomul viral

Spre deosebire de diferitele categorii de organisme celulare, a căror informaţie genetică este depozitată în moleculele de ADN care constituie genomul lor, virusurile au adoptat căi diferite pentru depozitarea informaţiei genetice. La unele grupuri, genomul viral este format din ADN d.c., ca la toate organismele vii, la altele din ADN m.c., ARN d.c. sau ARN m.c. (Subak-Sharpe, 1975), (fig. 8).

Cromosomii virali se deosebesc nu numai prin secvenţa lineară de baze, ci şi după o serie de proprietăţi fizico-chimice reprezentate de : a) natura moleculei (ADN sau ARN) ; b) dimensiunile ei (lungime, g.m.), respectiv cantitatea de informaţie genetică conţinută ; c) compoziţia în baze, uneori prezenţa unor baze sau zaharuri „anormale" ; d) structura genomului : m.c., d.c., moleculă unică sau formată din mai multe segmente, separate sau legate cap la cap prin legături necovalente ; e) topologie (molecule lineare, circulare, cu secvenţe repetitive terminale, extremităţi adezive, permutaţii circulare, superhelicale etc.).

Deşi semnificaţia celor mai multe dintre aceste proprietăţi este necunoscută, probabil că ele reflectă sau sînt corelate cu anumite activităţi esenţiale în cursul infecţiei virale. Astfel, extremităţile „adezive" ale fagului λ, care permit circularizarea moleculei în celula bacteriană, joacă un rol important în „ciclul de viaţă" al virusului, în timp ce la alte virusuri *(Herpes -, Adenovirus)* cu genom ADN d.c. linear circularizarea pare să fie o condiţie prealabilă integrării în genomul celulei-gazdă, deoarece se produce constant înainte de integrare.

Cunoaşterea proprietăţilor cromosomilor virali este esenţială pentru înţelegerea mecanismului replicării lor.

Mărimea genomului viral variază în limite foarte largi, greutatea lui moleculară, fiind cuprinsă între valori de 1,2 — 1,8. 10^6 dal la grupul *Parvovirus* (care conţine pe lîngă virusuri „normale" multe virusuri „defective" şi „satelite"), 25. 10^6 dal la *Adenovirus* şi 200.10^6 dal la grupul *Pox*. Numărul genelor variază între 3 *(Polyoma)* şi 160 *(Poxvirus)*.

Genomurile mai mici au o serie de avantaje, decurgînd din faptul că necesită mai puţin timp pentru replicare şi traducere, utilizează mai puţini precursori şi mai puţină energie pentru replicarea şi morfogeneza virusului şi, în plus, furnizează mai puţine ocazii de decodificare greşită în cursul transcrierii şi traducerii informaţiei lor genetice.

Compoziția în baze (G + C %) a genomului viral variază în limite largi, fiind cuprinsă la virusurile animale între 35 și 47%. Deși în unele cazuri coeficientul G + C poate prezenta variații mari chiar în cadrul grupului (de ex. la *Herpesvirus* între 46 și 74%), de cele mai multe ori el are semnificație pentru taxonomie.

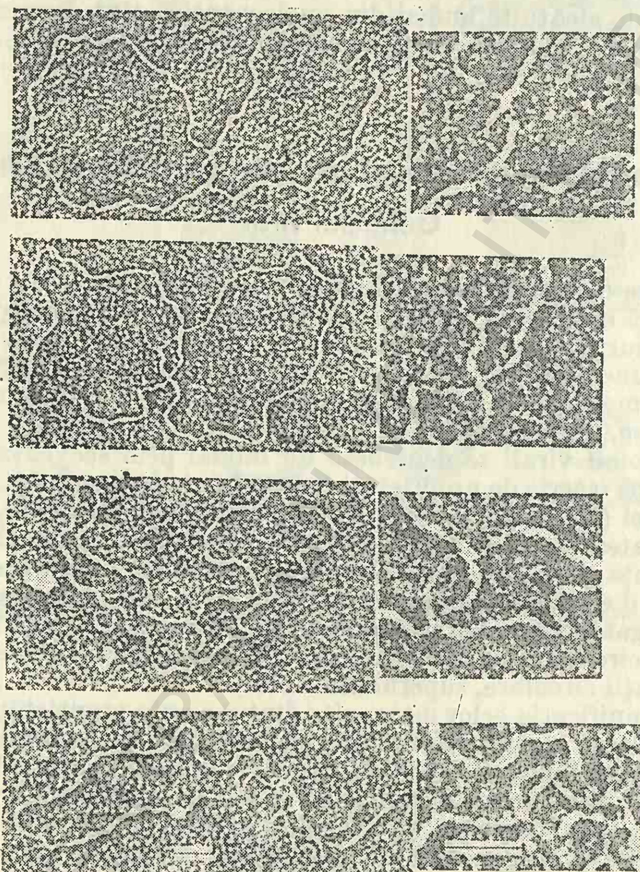


Fig. 8. — Genomul viral. Microelectronografia ADN fag ΦX174. Imaginea prezintă dimere catenate (forme replicative). Bara = 0,1 μm (după Gordon și colab., 1970).

În general, în cazurile virusurilor cu potențial oncogen, coeficientul G + C, corelat cu capacitatea de transformare malignă, este mai apropiat de cel al celulelor de mamifere (G + C 40%) decît la virusurile neoncogene. Spre exemplu, la adenovirusuri variază între 48% (tulpini foarte oncogene), 52% (slab oncogene) și 58% (neoncogene).

La unele virusuri *(Paramyxovirus)*, particula virală poate include mai multe copii ale genomului viral complet, în timp ce în alte cazuri particulele virale pot fi „goale", fiind lipsite de genom sau cu un genom incomplet, din care lipsește partea de acid nucleic necesară pentru infecțiozitate.

Virusurile fac economie de informaţie genetică pe mai multe căi, ca de exemplu :

1. Asamblarea capsidei prin gruparea simetrică a unui număr fix de molecule de proteină de acelaşi tip sau aparţinînd unui număr mic de proteine diferite.

2. Utilizarea unor proteine din celula-gazdă pentru efectuarea unor funcţii virale. De ex., replicaza fagului Qβ este alcătuită din 4 polipeptide diferite, dintre care numai unul este codificat de virus, celelalte trei aparţinînd celulei-gazdă.

3. Unele polipeptide capsidale îndeplinesc funcţii de reglare în procesul de replicare virală.

4. Utilizarea informaţiei genetice furnizată de alte virusuri : de ex., virusurile cu genom defectiv folosesc *virusuri ajutătoare* („helper") pentru a-şi efectua unele funcţii esenţiale: *virusul sarcomului Rous* are capacitatea de a produce transformarea malignă a unor celule animale, dar nu se poate replica niciodată decît în asociere cu *virusul leucemiei (virusul ajutător Rous)* care îi furnizează informaţia genetică necesară pentru sinteza proteinelor capsidale.

5. Citirea defazată (cu altă semnificaţie) a informaţiei genetice şi producerea a două polipeptide sub controlul aceluiaşi determinant genetic.

Virusurile cu genom ADN

Virusurile cu genom ADN, numite şi dezoxivirusuri, prezintă 7 tipuri principale de structură (fig. 9) :

1. **Genom ADN monocatenar linear** întîlnit la *Parvovirus*, fagul M13 şi virusul asociat cu adenovirusurile (VAA), un virus defectiv care are nevoie de prezenţa unui adenovirus pentru a se multiplica.

2. **Genom ADN monocatenar circular** prezent la fagul ΦX 174, la fagul filamentos *fd* şi la unele virusuri ale plantelor.

3. **Genom ADN dublu catenar linear** redundant, datorită secvenţelor terminale repetate identic situate la fiecare extremitate a moleculei. Acest tip de genom este prezent la fagul T7, la care toate genomurile sînt dublu catenare pe toată lungimea lor, au o secvenţă unică de gene, iar la extremităţi porţiuni lungi de nucleotide cu secvenţe identice.

4. **Genom ADN dublu catenar linear repetitiv (redundant) terminal,** ceea ce înseamnă că şi în acest caz „textul" genetic propriu-zis începe dincolo de capătul cromosomului, cu deosebirea că secvenţele repetate situate la cele două extremităţi ale fiecărei catene sînt complementare şi în ordine inversă („inverted" sau „reversed repetitive sequences"). Datorită acestui tip de structură, după denaturare, moleculele monocatenare se pot circulariza prin unirea extremităţilor repetate invers. Acest tip de genom este întîlnit la *Adenovirus*. Semnificaţia redundanţei terminale nu este cunoscută, probabil este implicată în procesul de replicare a ADN.

Moleculele de ADN d.c. lineare din adenovirusuri se pot circulariza dacă extremităţile 5′ ale celor două catene sînt reunite prin două molecule

de proteine „proteine de circularizare" (g. m. ~ 55 000 dal), care se leagă covalent de ADN şi interacţionează între ele. Proteinele de circularizare au un rol complex de facilitare a încapsidării genomului şi în replicarea acestuia. În plus, ADN viral circularizat prin intermediul acestei proteine este mult mai infecţios decît ADN linear deproteinizat.

5. **Genom ADN dublu catenar linear, redundant terminal, permutat circular.** Acest tip de genom este caracteristic fagilor din seria T-par, care au la fiecare extremitate secvenţe terminale provenite însă din regiuni diferite ale genomului. Datorită acestui fapt, diferitele molecule de ADN lineare extrase din fagii T4, deşi conţin aceeaşi informaţie genetică globală, au secvenţe nucleotidice diferite, datorate unor permutări circulare între diferitele regiuni ale genomului. Genomul fagilor T-par se poate circulariza *in vivo* datorită structurii extremităţilor, care prezintă o secvenţă terminală repetată. Prezenţa şi natura redundanţei terminale au fost demonstrate prin tratarea ADN T-par cu exonucleaza III care acţionează asupra moleculelor lineare, determinînd formarea unei molecule cu două extremităţi monocatenare complementare, care permit circularizarea moleculei.

Înţelegerea acestui tip de structură a fost simplificată cînd s-a demonstrat că formarea redundanţei terminale este consecinţa modului de replicare şi de încapsidare a ADN la fagii T-par: ADN este replicat cu formarea unei molecule imense de genomuri înşirate cap la cap (molecule *poligenomice concatemere* sau concatenate), care este secţionată la distanţe fixe în cursul încapsidării, în aşa fel încît fiecare segment conţine ceva mai mult decît un genom.

Dacă presupunem că molecula concatemeră de ADN este formată prin repetarea de mai multe ori succesiv a unui genom notat simbolic cu 6 litere (A B C D E F), avînd deci formula: ABCDEFABCDEFABCDEFABCDEF ... şi că ea este secţionată în cursul încapsidării în molecule succesive lungi de 8 litere, începînd din extremitatea stîngă, se vor obţine genomuri cu structura ABCDEFAB, CDEFABCD, EFABCDEF ş.a.m.d., care sînt terminal redundante pentru segmente succesive ale genomului, deoarece prin acest mecanism pot fi obţinute toate permutările.

6. **Genom ADN dublu catenar linear cu extremităţi monocatenare complementare (adezive).** Acest tip de genom este caracteristic fagului λ, care prezintă la capetele terminale ale fiecărei catene cîte o secvenţă nucleotidică lungă de 12 nucleotide complementare. În timp ce în particula fagică genomul rămîne totdeauna linear, în interiorul bacteriei-gazdă, *E. coli*, cele două extremităţi *adezive complementare* (engl. „cohesive ends" sau „cos") „se găsesc" una pe cealaltă şi se leagă formînd o moleculă de ADN d.c. circulară, care prezintă cîte o singură breşă („nick") pe fiecare catenă.

7. **Genom ADN dublu catenar circular închis covalent,** prezentînd ~20 de răsuciri superhelicale suplimentare sau *răsuciri terţiare* („tertiary kinks"), care dau naştere unei molecule suprarăsucite („supercoiled"). Acest tip de genom, fără nici o extremitate liberă, deoarece toate legăturile dintre nucleotide sînt covalente şi de tip fosfodiester, este caracteristic pentru virusurile polioma şi SV40. Acest tip de structură poate fi reprodus aşezînd în paralel două bucăţi de tub de cauciuc de laborator, rigid, care se răsucesc la ambele extremităţi, realizînd astfel un model comparabil cu

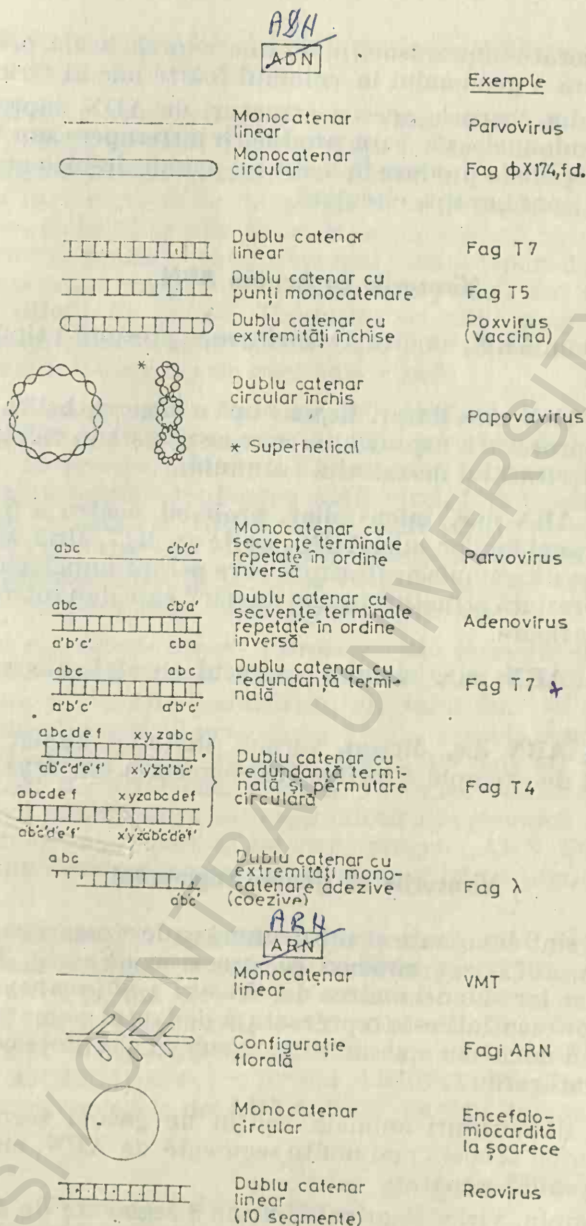


Fig. 9. — Diferite tipuri de structură ale genomurilor ADN şi ARN virale şi particularităţile structurale ale secvenţelor nucleotidice terminale (a, a'; b, b' etc. = secvenţe complementare) (modificat după Luria, 1978).

structura secundară a ADN d.c. linear. Dacă se încearcă să se unească cele două extremităţi ale acestei structuri, pentru a forma un cerc, apar noi răsuciri terţiare şi în locul unui cerc mic se va obţine o structură cu mai

multe bucle, datorate suprarăsucirii. Forma suprahelicală permite împachetarea compactă a genomului în volumul foarte mic al virionului.

Dacă una din catenele acestei structuri de ADN suprahelical este degradată de o endonuclează, care produce o întrerupere sau breşă monocatenară, capetele libere produse în acest fel permit desrăsucirea moleculei şi trecerea ei la configuraţia circulară.

Virusurile cu genom ARN

Virusurile cu genom ARN, numite şi *ribovirusuri*, prezintă 4 tipuri principale de structură.

1. **Genom ARN m.c. linear**, dispus după o simetrie helicală, corespunzător structurii proteice a capsidei, cu care se găseşte în relaţii strict definite, ca în cazul virusului mozaicului tutunului.

2. **Genom ARN m.c. intens pliat**, probabil pentru a fi mai uşor de împachetat, în cazul fagilor mici ARN , ca de ex. R17, MS2 şi f2. Datorită regiunilor întinse de complementaritate care permit împerecherea bazelor, unele porţiuni prezintă structuri în „ac de păr" care dau întregului cromosom un aspect de floare.

3. **Genom ARN m.c. circular**: virusul encefalomiocarditei şoarecelui.

4. **Genom ARN d.c. divizat**, format dintr-un număr caracteristic de segmente, ca de exemplu *Reovirus* (10 segmente) sau *Myxovirus* (8 segmente).

Virusurile cu genom segmentat

Aceste virusuri sînt cunoscute şi sub denumirea de *virusuri cu genom divizat* (von Kammern, 1972) sau *virusuri cu genom multipartit*. Fulton (1980) propune reunirea lor sub denumirea de *virusuri multicomponente*, deoarece caracteristica lor esenţială este reprezentată de faptul că materialul genetic este distribuit în două sau mai multe particule nucleoproteice. Ele aparţin la două mari categorii:

I. Unele ribovirusuri animale conţin un genom segmentat, astfel încît capsida virală acoperă mai multe segmente de ARN, cu lungimi diferite, care se replică separat.

Spre exemplu, virionul gripal conţine 8 segmente de ARN m.c., iar cel al reovirusurilor *) 10—12 segmente formate din ARN d.c. Virusurile oncogene cu genom ARN conţin 3 categorii de subunităţi de ARN, şi anume: 1) 3—4 subunităţi mari, conţinînd fiecare 10 000 nucleotide, care codifică polipeptidele virale; 2) 10—20 subunităţi similare ca mărime cu ARNt, avînd, probabil, rolul de „amorsă" („primer") pentru transcrie-

---

*) Reovirus = Respirator Enteric Orphan.

rea subunităţilor mari la ADN şi 3) subunităţi de ARN mici (70—200 nucleotide) cu funcţii încă necunoscute.

II. Cea de-a doua categorie este reprezentată de unele virusuri ale plantelor *(Tobra-, Bromo-, Como-, Nepo-, Cucumo-* şi *Ilarivirus)* şi de virusurile fungilor al căror genom este divizat în 2—4 segmente cu lungimi inegale şi la care segmentele de genom nu sînt încapsidate împreună (în acelaşi virion) ca la virusurile animale, ci individual în capside separate. Aceste virusuri se prezintă sub forma mai multor tipuri de particule virale, avînd toate aceeaşi compoziţie chimică a capsidei, dar conţinînd fiecare un segment diferit de genom. Producţia de virus progen (replicarea) şi îmbolnăvirea plantelor respective necesită infecţia simultană cu cel puţin un exemplar din fiecare tip de particulă virală.

Genul *Tobravirus* („Tobacco rattle") prezintă două tipuri de virioni, avînd acelaşi diametru (25 nm), dar lungimi variabile de 185 nm, respectiv 45—115 nm. Infectarea celulei cu virioni mari care conţin ARN cu g.m. $2,3 \times 10^6$ dal determină replicarea ARN viral, fără producerea de capsomere proteice, în timp ce virionii mici — care conţin un segment de ARN cu g.m. $0,6—1,3 \times 10^6$ dal — asigură sinteza de proteine capsidale, dar nu permit replicarea ARN. Replicarea virusului şi infecţia plantei sînt condiţionate de asocierea celor două tipuri de virioni.

Virusul mozaicului obsigii (Bromus) are genomul divizat în 4 segmente de ARN monocatenar linear, incluse în 3 capside de acelaşi tip, cu Ø ~26 nm şi simetrie icozaedrică, alcătuită din 180 subunităţi organizate în 20 hexamere şi 12 pentamere. Unele capside conţin ARN I(g.m. $1,02 \times 10^6$ dal), altele ARN II (g.m. $0,98 \times 10^6$ dal) şi, în sfîrşit, altele ARN III (g.m. $0,7 \times 10^6$ dal) şi ARN IV (g.m. $0,3 \times 10^6$ dal). Primele trei tipuri (mai grele) conţin întreaga informaţie genetică necesară pentru infecţia plantelor şi producerea de virus progen; ARN IV (cel mai uşor) este redundant deoarece poartă informaţie genetică prezentă şi în ARN III (fig. 10).

Virusul mozaicului lucernei (Alfalfavirus, AAV) prezintă virioni cu 4 dimensiuni diferite şi anume 3 baciliformi, cu dimensiuni de 58 × 18 nm (B), 48 × 18 nm (M) şi 36 × 18 nm (Tb) şi al patrulea tip elipsoidal (Ta) cu dimensiuni de ~28 × 18 nm. Cele 3 particule virale mari conţin cîte o moleculă de ARN fiecare: $1,1 \times 10^6$ dal ARN1(B), $1,0 \times 10^6$ dal ARN2(M) şi $0,7 \times 10^6$ dal ARN3 (Tb)*). Particulele elipsoidale conţin două molecule de ARN4 (Ta)*) cu g.m. $0,3 \times 10^6$ dal (ARN4

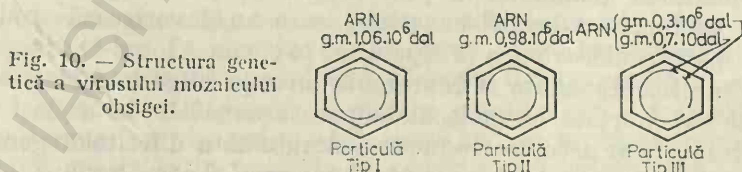


Fig. 10. — Structura genetică a virusului mozaicului obsigei.

*) Iniţialele B, M şi T indică nivelul de sedimentare a moleculelor respective după centrifugare în gradient de $CsCl_2$, în funcţie de greutatea lor, respectiv în zona inferioară (B — engl. *bottom*), în zona de mijloc (M = *middle*) sau în partea superioară (T = *Top*) a tubului.

este o moleculă de ARN care codifică informaţia genetică pentru proteina capsidei şi care se formează plecînd de la ARN3, fie prin clivarea moleculei, fie prin replicarea ei parţială).

Infecţia virală se produce dacă se injectează toate 4 tipurile de particule (respectiv de ARN) sau dacă pe lîngă cele 3 tipuri de particule mari, bacilare, se injectează o cantitate mică de proteină capsidală.Prin urmare, replicarea AAV şi infecţia plantei sînt dependente de prezenţa în celulă a proteinei sale capsidale (absolut necesară pentru exprimarea genomului) sau a „mesagerului" său (ARN4-Tb). Comportarea a fost explicată după ce s-a demonstrat că şi ARN3 poartă informaţia genetică necesară pentru sinteza proteinei capsidale, dar că această informaţie nu se poate exprima decît în prezenţa ARN4 sau a unei cantităţi mici de proteine capsidale. Această proteină este absolut necesară pentru formarea în plantă a moleculelor de ARN4. Ea are un rol de reglare a transcrierii informaţiei genetice, prin care o parte din ARN3 este transcris pentru a produce ARN4 (Houwink, 1978). Nevoia de ARN4 (foarte mic) pentru activarea infecţiozităţii celor 3 molecule mari de ARN s-ar explica prin aceea că ARN4 codifică *in vivo* suficientă proteină de capsidă, necesară pentru a avea un efect reglator asupra transcrierii celorlalte tipuri de ARN (Fulton, 1980). Este probabil că moleculele de ARN viral (AAV) conţin situsuri cu afinitate mare pentru proteina capsidală, care şi-ar îndeplini rolul de reglare ori de cîte ori este fixată pe aceste situsuri.

Semnificaţia biologică a genomului segmentat. Prezenţa genomului segmentat conferă anumite avantaje virusurilor respective, legate în special de apariţia de noi caracteristici, consecutive formării unor genomuri noi şi deci a unor virusuri „noi" prin reasortarea unor segmente genomice provenite de la virusuri diferite. Acest mecanism, numit de Gibbs şi Harrison (1976) „pseudorecombinare", care înlocuieşte recombinarea genetică (prin rupere şi reunire), măreşte spectrul de variabilitate al virusurilor şi în special le poate ajuta să învingă rezistenţa organismelor-gazdă.El ar explica apariţia tulpinilor noi de virus gripal şi a pandemiilor grave de îmbolnăviri umane prin schimbarea unui sau mai multor segmente proprii virusului uman cu un segment de virus aviar, porcin sau ecvin (Laver şi Webster, 1973). Posibilitatea schimbului liber de material genetic prin reasortare de gene poate fi considerată ca un înlocuitor al recombinărilor genetice aparent foarte rare la virusurile ARN şi demonstrează existenţa unor interacţiuni cooperante la nivel molecular în cursul replicării virale (van Vloten-Doting, 1974).

Segmentarea genomului ar putea reprezenta o adaptare la „maşinăria" de traducere a celulei eucariote, care nu favorizează traducerea mesajelor mari, policistronice (Jaspars, 1974; van Vloten-Doting, 1977). Virusurile multicomponente ar reprezenta mesaje oligocistronice, separat încapsidate sau purtate ca molecule separate de ARN în acelaşi virion. Această structură ar permite traducerea simultană a diferitelor gene şi ar putea asigura traducerea preferenţială a unor gene al căror produs (proteine capsidale) este necesar în cantitate mai mare.

Prezenţa unor virioni cu dimensiuni diferite poate asigura repartizarea lor în situsuri preferenţiale în celulă, din care decurge o rată diferenţiată

în sinteza particulelor cu dimensiuni diferite şi o separare în timp şi spaţiu în celulă a funcţiilor diferitelor segmente ale genomului divizat (Harrison, 1976).

În unele cazuri, cantitatea de informaţie genetică este prea mare pentru a putea fi inclusă într-o singură particulă, limitată ca formă şi ca dimensiune de constrîngeri fizico-chimice şi geometrice. În timp ce unele virusuri cilindrice şi-au adaptat lungimea particulei la mărimea genomului (VMT), virusurile icozaedrice pot realiza protejarea informaţiei genetice, prin divizarea genomului.

Un alt avantaj decurge din faptul că virusurile mici invadează mai uşor ţesuturile. Prezenţa virionilor la nivelul plasmodesmei sugerează posibilitatea trecerii virusului de la o celulă la alta pe această cale. Or, mărimea plasmodesmei poate reprezenta o limită superioară pentru diametrul virionului (Fulton, 1980).

Infecţia cu virusuri multicomponente implică introducerea simultană în celule, în acelaşi loc sau în situsuri foarte apropiate, a tuturor particulelor complementare. Acest mecanism poate constitui un dezavantaj numai în cazul virusurilor aflate în soluţii foarte diluate, situaţie care nu se întîlneşte în condiţii naturale.

Virusurile cu genom capabil de integrare în genomul celular

Genomul dezoxivirusurilor animale (cu excepţia virusului *Pox)* şi cel al fagilor ADN se poate integra periodic în genomul celulei-gazdă. Capacitatea de integrare este condiţionată de prezenţa informaţiei genetice speciale pentru integrare, pentru menţinerea acestei stări, ca şi pentru împiedicarea exprimării genomului viral integrat. Aceste proprietăţi au fost studiate în detaliu la fagul λ.

Unele virusuri animale capabile de integrare în genomul celulei-gazdă produc concomitent transformarea malignă a acesteia (virusuri oncogene). Virusurile oncogene cu genom ARN *(Oncornavirus)* se integrează prin intermediul unei transcrieri la ADN d.c.

Capacitatea unor virioni de a-şi integra genomul în cel al celuleigazdă reprezintă o funcţie dobîndită, înalt specializată, reprezentînd o adaptare extremă (Joklik, 1974).

Prezenţa acizilor nucleici aparţinînd celulei-gazdă în virioni

Ca regulă generală, virionii conţin acidul nucleic viral corespunzător genomului lor. În anumite cazuri (de ex., fagii transductori), o parte din informaţia genetică a celulei-gazdă poate fi încorporată în genomul viral.

Echivalentul genetic al fagilor transductori a fost evidenţiat şi în cazul anumitor virusuri animale, care nu pun probleme riguroase de limitare în spaţiu (prin prezenţa de „spaţiu excedentar" sau extensibil ca la virusurile cu peplos). În aceste cazuri, informaţia genetică provenită de la gazdă poate fi integrată în genomul viral, fără pierderea unei cantităţi echivalente din informaţia proprie acestuia. Se obţin virusuri care

conţin informaţie străină, dar care continuă să se multiplice, deoarece nu sînt defective.

În cazul virusurilor icozaedrice, care nu permit decît încapsidarea unei cantităţi limitate de informaţie genetică, încorporarea de material genetic provenit din celula-gazdă este compensată prin reducerea corespunzătoare a genomului viral : aceasta duce la formarea de virusuri defective, bine cunoscute în cazul bacteriofagilor (fagi transductori), care există probabil şi în cazul virusurilor animale, unde nu au fost încă descrise, probabil din cauza lipsei mijloacelor de detectare (Joklik, 1974).

Prezenţa genelor provenite din celula-gazdă a fost evidenţiată în cazul papovavirusurilor la care „pseudovirionii'' conţin un segment de ADN linear, provenit din celula-gazdă avînd aceeaşi mărime ca şi genomul viral, sau o moleculă de ADN cu secvenţe parţial virale şi parţial celulare. Aceste tipuri de genomuri hibride se formează atunci cînd genomurile virale integrate în ADN-gazdă sînt excizate imperfect.

Particulele virale care conţin ADN din celula-gazdă au atras atenţia cercetătorilor datorită potenţialului lor de a transduce gene ale gazdei de la o celulă la alta. Fenomenul ar putea fi exploatat pentru corectarea defectelor genetice de metabolism.

Infecţiozitatea acizilor nucleici virali

Acizii nucleici virali conţin toată informaţia genetică necesară pentru formarea întregii particule virale. Infecţiozitatea acizilor nucleici virali a fost demonstrată iniţial pentru ADN fagic (Hershey şi Chase, 1952) şi ulterior pentru ARN din virusul mozaicului la tutun (Gierer şi Schramm, 1956).

În cazul virusurilor animale sînt infecţioşi toţi acizii nucleici, care sînt transcrişi la ARNm de ARN-polimerazele celulei-gazdă sau care acţionează ei înşişi ca ARNm. În această categorie intră acizii nucleici proveniţi de la *Picorna-*, *Toga-*, *Papova-*, *Adeno-* şi *Herpesvirus*. Acizii nucleici virali care sînt transcrişi la ARNm de polimeraze codificate de virus (de ex., ARN« — »proveniţi de la *Myxo-*, *Rhabdovirus* şi ARN d.c. de la *Reovirus*) nu sînt infecţioşi.

Acizii nucleici virali izolaţi au o infecţiozitate de $10^3 - 10^6$ ori, mai mică decît aceea a virionilor din care sînt extraşi, datorită degradării lor rapide de către nucleazele prezente în lichidele extracelulare, ca şi în membranele celulare, precum şi faptului că sînt slab fixaţi de celule. Infecţiozitatea redusă a acizilor nucleici izolaţi demonstrează rolul capsidei în adsorbţia şi fixarea virionilor pe celule. Înglobarea lor poate fi favorizată prin tratare cu soluţii saline care stimulează pinocitoza, prin complexarea cu policationi, ca protamină sau DEAE-dextran, sau prin adsorbţia pe fosfat de calciu precipitat care este bine fixat pe celule.

Spectrul de gazde al acizilor nucleici virali izolaţi este mult mărit în raport cu cel al particulei virale mature, la care intervine specificitatea de interacţiune dintre capsidă şi receptorii specifici celulari.

Teoretic, acizii nucleici virali, dacă nu sînt degradaţi de nucleaze, se pot replica în orice celulă în care au pătruns. De exemplu, în timp ce virionii de *Poliovirus* infectează numai celulele umane sau de primate, ARN respectiv se replică şi în celulele de pui de găină sau şoarece, care în mod normal nu sînt permisive pentru acest virus.

Capsida virală

Materialul de bază pentru construcţia capsidei este *unitatea structurală* sau *biochimică*, care reprezintă cea mai mică unitate funcţională de construcţie a capsidei şi este formată fie dintr-un lanţ polipeptidic, fie dintr-un agregat de lanţuri polipeptidice identice sau diferite. La virusurile cu simetrie helicală aceste unităţi sînt vizibile, ca atare, la microscopul electronic.

La virusurile izometrice („sferice"), unităţile structurale formează grupări simetrice, vizibile la microscopul electronic, numite *unităţi morfologice* sau *capsomere* (gr. *meros* = parte) (Caspar şi Klug, 1962). Folosind o terminologie mai simplă, Lwoff şi Tournier (1967) consideră că la ambele tipuri de virusuri capsida este alcătuită din capsomere, cu diferenţa că la virusurile helicale capsomerele sînt formate dintr-o singură moleculă de proteină (sînt deci monomere şi reprezintă unităţi structurale şi morfologice), pe cînd la virusurile izometrice sînt alcătuite din grupuri de 5—6 molecule (sînt deci oligomere şi constituie unităţi morfologice).

După terminologia lui Fenner (1979), unităţile structurale pot fi polipeptide unice şi corespund unei unităţi chimice (produsul final al unei gene virale) sau pot fi formate din mai multe polipeptide formînd homo- sau heteropolimere. Unităţile structurale ca atare sau grupuri de unităţi structurale pot fi văzute la microscopul electronic ca unităţi morfologice ale capsidei (capsomere).

Capsomerele variază ca mărime şi formă de la un virus la altul şi sînt asociate între ele după reguli simple, dar extrem de precise, derivate din legile fundamentale ale cristalografiei, realizînd structuri cu simetrie helicală sau icozaedrică. Numărul unităţilor structurale şi morfologice din structura unui virion, ca şi dimensiunile lor sînt controlate genetic şi, ca urmare, riguros constante.

Proteinele capsidale au în general g.m. 12 000 — 110 000 daltoni şi la unele virusuri, ca virusul mozaicului tutunului (VMT), şi la cele mai multe virusuri ale plantelor sînt identice. Alte virusuri, de exemplu, SV40, conţin 3 proteine diferite, *Adenovirus*, 12 polipeptide diferite, iar *Poxvirus* peste 30 de proteine structurale diferite.

Proteinele interne. Cele mai multe virusuri izometrice şi virusurile complexe conţin „proteine interne" situate în interiorul capsidei, asociate cu genomul viral, într-un mod încă neelucidat, pentru a forma împreună „corpul central" sau „nucleoidul" viral. La unele virusuri, rolul proteinelor interne ar fi acela de a menţine condensat ADN viral în interiorul nucleoidului.

Enzimele asociate cu virionii

Unul din caracterele discriminatorii esenţiale ale virusurilor este lipsa echipamentului enzimatic de biosinteză şi producere de energie, care le deosebeşte de sistemele biologice elementare care sînt bacteriile. Cu toate acestea, este evident că unele virusuri animale au activităţi enzimatice care fac parte din structura virionilor.

Prima enzimă virală descoperită a fost neuraminidaza virusului gripal (Hirst, 1942) considerată iniţial ca provenind din celulele şi ţesuturile organismului-gazdă. Ulterior, s-a demonstrat că informaţia genetică pentru sinteza ei este codificată în genomul viral (Dreniek, 1972).

Dovada că enzimele aparţin efectiv structurii virionilor a fost făcută numai în cazul virusurilor *Pox* la care: a) enzimele rămîn asociate cu virionii şi după purificarea lor extensivă; b) sînt asociate cu unele structuri interne cum este „corpul central" al virionului şi c) activitatea lor este obişnuit amplificată după îndepărtarea proteinelor virale exterioare, ceea ce demonstrează că enzimele nu sînt pur şi simplu adsorbite pe suprafaţa externă a virionilor (McAuslan, 1977).

Situaţia este mai greu de clarificat în cazul virusurilor mici, la care enzimele s-ar putea adsorbi pe substructurile virale, în cursul asamblării şi maturării virionilor, în special în cazul enzimelor existente şi în celula-gazdă, care pot fi situate mai curînd pe suprafaţa virusurilor decît în structura lor, sau în cazul unor enzime asociate cu unele virusuri ca herpesvirusul, greu de purificat de învelişul său extern care conţine constituenţi celulari.

Enzime asociate cu virionii au fost descrise la mai multe tipuri de virusuri.

Virusurile *Pox* conţin endo- şi exonucleaze, o ARN-polimerază (transcriptaza) cu rol în stadiile iniţiale ale infecţiei, nucleotidfosfohidrolazele I şi II, proteinkinaze, ATPază, precum şi o guanilil- şi o metiltransferază răspunzătoare de modificarea ARNm viral. Unele ribovirusuri, ca de exemplu paramixovirusurile şi rhabdovirusurile, conţin enzime ca ARN-polimeraza dependentă de ARN, virusul influenzei conţine neuraminidază şi ARN-polimerază, în timp ce oncovirusurile conţin pe lîngă transcriptaza inversă, de origine virală, endonucleaze, ligaze, transferaze (dATP→dCTP), kinaze, cu origine discutabilă, unele aparţinînd virionului, altele preluate din celula-gazdă în momentul „înmuguririi".

Funcţiile enzimelor virale. *Neuraminidaza*, prezentă la *Ortomyxo-* şi *Paramyxovirus*, este enzima virală cel mai mult studiată şi care desfăşoară activitatea cea mai complexă, deşi încă insuficient elucidată.

Localizată la nivelul spiculelor învelişului extern viral, neuraminidaza este o glicoproteină funcţională sub formă oligomeră (di- sau tetrameră). Ea degradează mucoproteinele care protejează căile respiratorii ale animalelor, favorizînd fixarea virionilor de celulele sensibile. Prin degradarea receptorilor celulari de virus (clivarea legăturilor glicozidice care leagă grupul keto- al acidului neuraminic la D-galactoză şi D-galactozamină) contribuie la pătrunderea virionului în celulă. Cînd pătrunderea virusului în celulă nu este posibilă, de exemplu după adsorbţia lui pe hematii, enzima acţionează pînă cînd tot acidul N-acetilmuramic este îndepărtat de pe toţi receptorii celulari, după care virusul este eluat.

Distrugerea receptorilor celulari de pe suprafața membranelor celulare, de care rămîn fixați virionii după multiplicare, permite eliberarea virusului și infectarea celulelor învecinate. Neuraminidaza este implicată și în procesul de asamblare și maturare al virionilor. În plus,îndepărtînd acidul sialic prezent în învelișul extern al virionilor împiedică agregarea acestora în grămezi, asigurîndu-le capacitatea infecțioasă și patogenitatea.

ARN-polimerazele sau transcriptazele virale. Nevoia de ARN-polimeraze decurge din necesitatea exprimării acizilor nucleici virali imediat după pătrunderea lor în interiorul celulei-gazdă.

În cazurile în care genomul viral însuși poate acționa ca ARNm (ca la *Picorna-* și *Togavirus* care au genom ARN « + ») transcrierea informației genetice virale nu ridică probleme speciale. În cazul virusurilor cu genom ADN sau cu genom ARN cu polaritate « — », care nu pot acționa direct ca ARNm, este necesară sinteza de ARN « + » care se poate realiza pe două căi:

a) folosind enzime prezente în celula-gazdă, ca în cazul virusurilor *Herpes-*, *Adeno-* și *Papova*, sau

b) utilizînd enzime prezente în virion, ca în cazul virusurilor *Pox-*, *Myxo-*, *Paramyxo-*, *Reo-* și *Rhabdo*. Aceste enzime sînt inactive în virionul intact, dar sînt activate după ce învelișul viral sau capsida sînt parțial degradate, curînd după infectarea celulei-gazdă.

Endonucleazele prezente la *Adenovirus* și SV40 joacă un rol important în oncogeneză, prin integrarea genomului viral în genomul celulei-gazdă, în timp ce celelalte nucleaze virale pot fi implicate în replicare, recombinare, ca și în „împachetarea" genomului în virion (McAuslan, 1975). Nucleazele din virusurile *Pox* au fost încriminate în inhibarea replicării genomului celular.

Proteinkinazele prezente la *Herpes-* și *Poxvirus* pot acționa ca regulatori ai funcțiilor celulare (activarea genelor din nucleu) și pentru pregătirea genomului viral pentru transcriere și replicare.

Nucleozid-trifosfat-fosfohidrolazele au fost descrise la virusurile *Pox* și la reovirusuri. Fosfohidrolaza I hidrolizează numai ATP și dATP și este stimulată numai de ADN, în timp ce fosfohidrolaza II hidrolizează, deopotrivă ribo- și dezoxinucleozidtrifosfații și este stimulată fie de ARN, fie de ADN.

Rolul lor biologic nu este încă definit, dar se crede că ar fi implicate în extruzia ARN născînd din nucleoidul viral sau în replicarea ADN (Kates, 1970).

Transcriptaza inversă („reverse transcriptase") sau ADN-polimeraza dependentă de ARN prezentă la retrovirusuri (virusurile sarcomului și leucemiilor aviare etc.), codificată de genomul viral, joacă un rol esențial în oncogeneză prin „transcrierea inversă" a genomului ARN la ADN care este integrat în genomul gazdei, ca și în producerea de molecule de ARN viral (Temin și Baltimore, 1972).

Învelişul extern

După Fenner (1974), denumirea de *peplos* sau *de înveliş extern* trebuie limitată la învelişurile lipoproteice ale virusurilor care se maturează în cursul înmuguririi prin membranele celulare. Cele mai multe virusuri *(Orthomyxo-, Paramyxo-, Oncorna-, Toga-, Rhabdo-, Coronavirus* ş.a.) îşi formează învelişul extern în momentul în care virionul „înmugureşte" prin anumite zone ale membranei celulare, în timp ce părăseşte celula-gazdă. Fac excepţie *Herpesvirus*, a cărui maturare are loc prin „înmugurirea" prin membrana nucleară, şi alte virusuri *(Pox*, lipofagii (PM2) ş.a.), la care modul de formare a peplosului nu este complet elucidat (fig. 11).

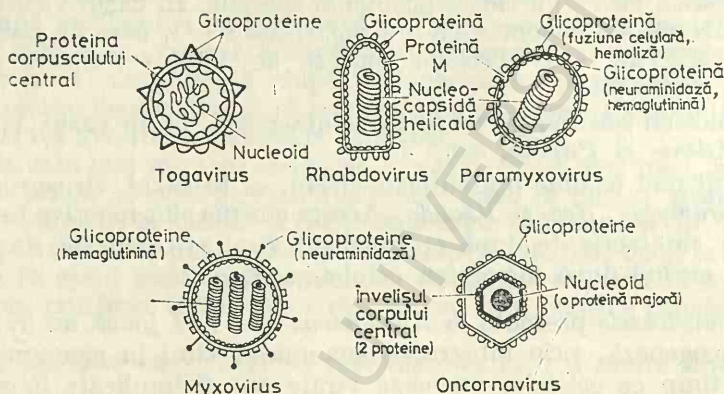


Fig. 11. — Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de înveliş viral la virusurile cu genom ARN m.c. (modificat după Casjens şi King, 1975).

Este alcătuit dintr-un strat central, care poate fi „ţintuit" pe suprafaţa sa externă cu o serie de proeminenţe de suprafaţă sau spicule („spikes") de natură glicoproteică, iar pe faţa internă este acoperit cu o foiţă adiţională alcătuită din molecule de proteină. Stratul central are o structură tipic trilaminară, cu aspect de unitate de membrană („unit membrane"), şi este format dintr-o „foiţă" bimoleculară de lipide, aşezate în strat continuu, care separă spiculele de ceilalţi constituenţi ai virionului. El reprezintă o entitate stucturală capabilă să-şi menţină integritatea, cel puţin în anumite limite, deoarece nu se modifică după îndepărtarea spiculelor. Lipidele care îl formează provin din celula-gazdă şi sînt de tipul celor din membrana plasmatică a celulei în care a avut loc multiplicarea (Klenk, 1973). Datorită acestui fapt, virusurile cultivate în diferite tipuri de celule au în structura învelişului lor extern diferite tipuri de lipide, fără ca proprietăţile biologice ale virionului, inclusiv infecţiozitatea, să fie modificate. Proporţia mare de sfingolipide, în particular glicosfingolipide şi acizi graşi cu lanţ foarte lung (16—26 atomi de carbon), ca şi prezenţa unei concentraţii mari de colesterol favorizează formarea de structuri strîns legate, care conferă învelişului viral un grad ridicat de organizare şi rigiditate.

Cele mai multe proteine ale învelişului extern sînt specific virale, deşi în unele cazuri se pot întîlni asociate şi proteine aparţinînd celulei-gazdă, încorporate în peplos în cursul „înmuguririi" prin membrana celulară.

Glicoproteinele au greutatea moleculară 10 000—100 000 daltoni şi conţin 5—40% glucide. Sînt alcătuite, de regulă, dintr-un schelet polipeptidic pe care sînt legate lanţuri laterale de carbohidraţi, compuse din manoză, galactoză, fucoză, N-acetilglucozamină şi uneori chiar acid muramic. Ele sînt de natură specific virală deşi, în unele cazuri, pot fi structuri hibride, parţial specificate de virus şi parţial de celula-gazdă (Burge şi Huang, 1970).

Spiculele sînt prelungiri („proiecţii") situate pe suprafaţa externă a învelişului extern (denumite eronat „ace" sau „ţinte" deoarece cel mai adesea ele nu au extremităţi ascuţite, ci drepte sau în „butoni"), alcătuite din glicoproteine virale. Ele pot fi îndepărtate complet de pe suprafaţa virusului cu ajutorul enzimelor proteolitice (Klenk, 1973). Cele mai mult studiate sînt cele de la *Orthomyxovirus* cunoscute sub denumirea de *hemaglutinine* şi *neuraminidaze*.

Proteinele de membrană (M). Învelişul extern al unor virioni *(Orthomyxo-, Paramyxo-, Rhabdovirus)* conţine un polipeptid major (cantitativ) cu g. m. cea mai mică dintre toate proteinele virale — proteina de membrană (M). Ea înveleşte complet suprafaţa internă a stratului dublu lipidic, care o protejează de degradarea proteolitică. Deşi observaţiile electronografice sugerează că această proteină ar forma o entitate structurală — membrana corpului central — studiile de fracţionări celulare demonstrează apartenenţa ei la structura învelişului extern.

Arhitectura moleculară a virusurilor

Greutatea moleculară mare a preparatelor virale cristalizate a dus la ideea că cel puţin unele virusuri „sferice" *(Poliovirus)* sau cilindrice (VMT) — considerate iniţial ca fiind alcătuite dintr-o moleculă unică enormă — ar putea fi în realitate formate după modelul macromoleculelor, dintr-o serie de subunităţi moleculare identice, aşezate în mod ordonat.

Bazele teoretice ale ipotezei relativ la realitatea acestui tip de construcţie au fost enunţate de Watson şi Crick (1956) care, analizînd raportul dintre mărimea genomului viral şi greutatea moleculară a proteinelor virale, au ajuns la concluzia că acesta este insuficient pentru a codifica sinteza unei molecule proteice enorme sau a unui număr mare de proteine diferite. Ca urmare, ei au presupus că învelişul proteic al virionului ar fi format din numeroase molecule proteice identice. Ca un corolar, Watson şi Crick consideră că acest tip de structură, în care construcţia învelişului viral este realizată prin utilizarea unui număr mare de proteine identice, impune cu necesitate o *aranjare simetrică* a subunităţilor identice, în aşa fel încît ele să aibă ambianţe chimice identice. În plus, ei au ajuns la deducţia că dintre tipurile de simetrie cunoscute, numai două — *simetria helicală* şi cea *cubică* sau *cvasicubică* — permit împachetarea subunităţilor proteice în mod regulat sau cvasiregulat, în aşa fel încît, exceptînd

contactele lor cu genomul viral, fiecare dintre acestea să fie plasată într-o ambianță chimică identică.

În sprijinul acestei concepții pledează datele privind virusul mozaicului tutunului (VMT) al cărui genom (ARN) conține aproximativ 6 000 de nucleotide. În cazul în care acest genom ar codifica un singur lanț polipeptidic de 2 000 de aminoacizi, s-ar forma o proteină cu o greutate moleculară ($\sim 2{,}5 \times 10^5$ dal) mult inferioară aceleia a învelișului proteic viral ($\sim 3{,}5 \times 10^7$ dal).

Datorită acestui fapt, chiar în cazul în care întreg genomul ar fi folosit pentru a codifica exclusiv proteină structurală (ceea ce în realitate nici nu se întîmplă), tot ar fi necesare circa 150 de molecule identice de proteină pentru capsida unui virion. Tipul de organizare prin dispoziția simetrică a numeroase subunități identice are deci mari avantaje biologice, în primul rînd prin aceea că permite o importantă economie de material genetic. Într-adevăr, dacă proteina virusului ar consta dintr-o moleculă unică imensă, cantitatea de ADN necesară pentru a-i dirija sinteza ar fi atît de mare, încît ea nu ar putea fi inclusă în virion; în plus, construirea unei particule virale sferice sau în formă de bastonaș cu ajutorul unei singure molecule polipeptidice enorme ar fi foarte dificilă. Acest gen de structură complexă, pornind de la subunități identice, constituie prin urmare o modalitate eficientă de folosire a cantității limitate de material genetic reprezentat de acidul nucleic viral, modalitate care este în același timp mai simplă și mai economică — știut fiind faptul că, în general, este mai ușor să se producă în cantități mari orice structură complexă prin asamblarea unor structuri mai mici preformate decît pornind direct de la materia primă.

Organizarea simetrică a virusurilor a fost confirmată și prin microelectronografii, care, în unele cazuri, au evidențiat o organizare clară a capsidelor, corespunzînd aranjării regulate a elementelor proteice din care sînt formate.

Numeroși cercetători s-au preocupat de modul în care ar putea fi construită particula virală, respectiv de modul în care s-ar putea realiza asamblarea materialului de construcție pentru a forma un virion. În acest scop s-a recurs la modele geometrice și la mulaje, atît pentru construcția subunităților, cît și pentru asamblarea lor. Imaginea oferită de mulaje este însă pur convențională, deoarece moleculele de proteine, din cauza structurii lor spațiale, nu reprezintă obiecte geometrice cu margini perfect clar definite, iar proprietățile lor de adaptare, adică de armonizare și „montare" într-un ansamblu, nu depind numai de forma moleculei, ci și de localizarea și specificitatea legăturilor ei chimice. Cu alte cuvinte, ceea ce definește în realitate construcția particulei virale este mai ales „potrivirea" stereochimică și aceasta poate fi reprezentată printr-o formă regulată, geometrică, numai în mod arbitrar și cu scop didactic.

Simetria virusurilor

Orice structură ordonată constituită din unități identice, fie că este un cristal, fie că este o particulă virală, are un tip de simetrie bine definit, o anumită armonie de organizare rezultînd din modul de așezare a părților constitutive și din regularitatea proporțiilor acestora.

În cazul virusurilor, moleculele de proteină care alcătuiesc capsida şi care de obicei sînt de acelaşi tip se grupează în mod ordonat, reproducînd în aranjarea lor trei tipuri de simetrie: 1) helicală (VMT, virusul gripal); 2) cubică sau icozaedrică *(Adeno-, Polio-, Herpes virus)*; 3) binară sau complexă (bacteriofagi şi virusuri de tip variolă- vaccină).

Organizarea unor particule alcătuite din elemente structurale (subunităţi) identice nu poate fi decît regulată şi ascultă de legile teoriei geometrice a grupelor de simetrie, al căror exemplu cel mai cunoscut este cel al cristalografiei geometrice. În acord cu principiul echivalenţei, toate elementele componente ale unei structuri organizate simetric trebuie să aibă o ambianţă identică, adică să fie înconjurate de elemente asemănătoare, aşezate în acelaşi mod. Acest mod de organizare a fost evidenţiat de studiul unor virusuri prin microscopie electronică şi difracţie cu raze X. În cazul virusurilor există o anumită abatere faţă de stricteţea cu care acest principiu acţionează în cristalografie, decurgînd din faptul că subunităţile componente sînt molecule relativ mari, care se pot deforma uşor. Ca urmare, există posibilitatea ca în cazul virusurilor *principiul echivalenţei* să nu se aplice cu toată rigurozitatea, dar excepţiile nu sînt reprezentate de fenomene anarhice. Legile care dirijează fenomenele de asamblare a structurilor simetrice virale au fost definite de Caspar şi Klug (1962) sub denumirea de *principiul cvasiechivalenţei*.

Teoria geometrică a grupelor de simetrie se aplică cu cea mai mare rigurozitate capsidei proteice. Genomul viral poate avea sau nu aceeaşi simetrie ca şi capsida, după cum este legat mai mult sau mai puţin intim cu moleculele componente ale acesteia. În numeroase cazuri, la virusurile izometrice acidul nucleic poate prezenta o simetrie diferită de cea a capsidei.

1) Virusurile cu simetrie helicală

Simetria helicală poate fi definită prin aşezarea unităţilor componente în funcţie de două operaţiuni repetate, şi anume prin rotaţia în jurul unui ax, cuplată cu o mişcare de translaţie, paralelă cu acelaşi ax (ca aceea a unui şurub). În cazul unui virus în formă de bastonaş, cu simetrie helicală (de ex. VMT), putem considera capsida ca fiind construită din unităţi structurale echivalente (molecule de proteină) aşezate în mod repetat printr-o operaţie de rotaţie de „r" grade (fig. 12), urmată de o mişcare de translaţie de „t" nanometri. Aceste două operaţii asigură dispunerea unităţilor proteice în aşa fel încît ele definesc o suprafaţă „cilindrică" cu structură helicală. Numărul de subunităţi pe tur de spiră (n) este determinat de relaţia $n = 360$, iar pasul helicei de „$n.t.$".

Figura 13 ilustrează modul de construcţie a unui virion cilindric, cu simetrie helicală, prin rularea unei reţele plane alcătuită din unităţi de construcţie aşezate simetric.

Unele virusuri conţin nucleocapside helicale flexibile, fapt care le permite aşezarea într-o formă răsucită în mod regulat atunci cînd sînt acoperite de un înveliş extern sau cu o formă lineară flexuoasă (filamentoasă) cînd sînt nude.

În această categorie intră cîteva grupuri principale de virusuri: a) grupul *Myxovirus* (Influenza) și *Paramyxovirus* (Parainfluenza) considerate inițial ca sferice; b) grupul *Rhabdovirus*, avînd forma unui cartuș;

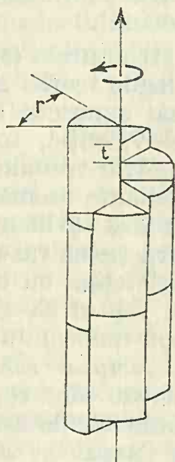
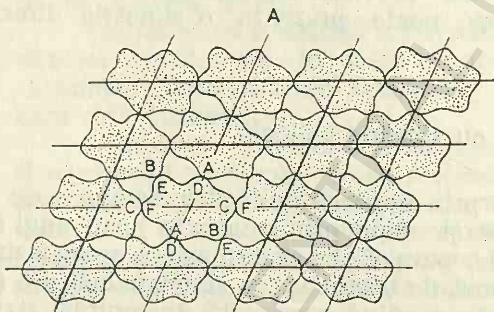
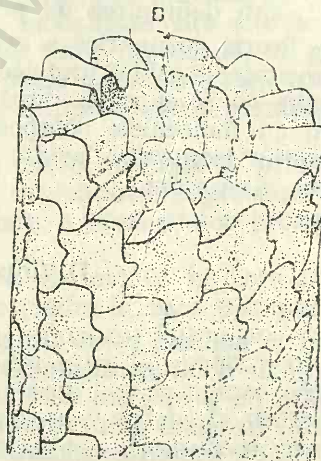


Fig. 12. — Un cilindru cu simetrie helicală se formează prin operațiuni repetate de rotație (r) și translație (t) de-a lungul unui ax, ca pe un șurub (după Mattern, 1977).

Fig. 13. — Reprezentarea diagramatică a modului de asamblare a unui virion cu formă cilindrică. Forma subunităților impune așezarea lor ordonată, una lîngă alta. Literele indică regiunile de interacțiune, care sînt aceleași pentru toate subunitățile, conform principiului echivalenței (A). Rularea rețelei plane determină formarea unui cilindru cu simetrie helicală (B).





c) unele virusuri patogene pentru plante (gălbenirea sfeclei de zahăr) și d) unii bacteriofagi (Mattern, 1977).

Virusuri cu nucleocapsidă rigidă

Virusul mozaicului tutunului

(Pl. 1)

VMT este unul dintre virusurile cu structura cea mai bine cunoscută datorită studiilor de microscopie electronică și de difracție a razelor X. Particula lui virală, corespunzînd unei nucleocapside rigide nude, are forma unui cilindru gol, lung de 300 nm și cu diametrul exterior de 18 nm. Această structură rezultă din aranjarea după o simetrie helicală a 2 130

molecule de proteină identice, avînd forma unor discuri elipsoidale (g.m. ~ 17 500 dal), alcătuite, fiecare, din 158 de aminoacizi, a căror secvență este perfect cunoscută (fig. 14).

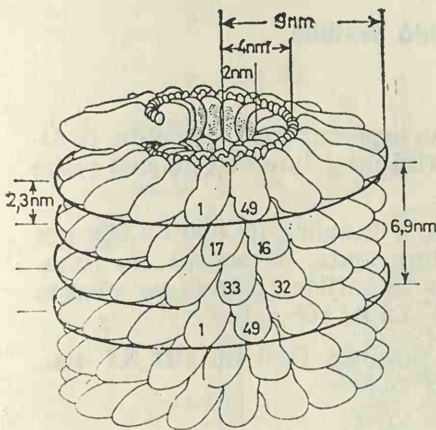
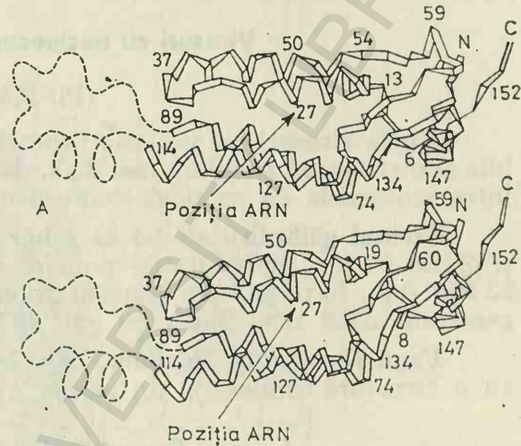


Fig. 14. — Reprezentarea schematică a unei porțiuni din virionul de VMT.



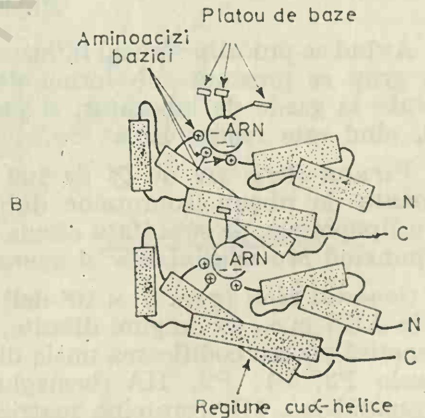


Fig. 15 — VMT. A. Așezarea a două subunități suprapuse într-un disc de proteină și relațiile lor cu genomul ARN: C, extremitatea C-terminală; N, extremitatea N-terminală; punctat, regiuni cu structură incomplet cunoscută (cifrele indică poziția aminoacizilor în lanțul polipeptidic). B. Așezarea genomului ARN în raport cu două subunități polipeptidice suprapuse (după Stubbs și colab., 1977).

Structura tridimensională a acestor proteine este aceea a unui lanț polipeptidic ale cărui extremități C- și N-terminale sînt apropiate între ele și situate spre exterior. Partea situată spre interiorul lanțului cuprinde regiuni dispuse în α-helice și regiuni cu o structură încă incomplet definită.

Subunitățile proteice sînt aranjate în așa fel încît 49 de molecule formează trei tururi de spiră (respectiv 16 1/3 molecule corespund la fiecare tur de elice cu pasul de 2,3 nm). Zona centrală, goală, a cilindrului are o rază de ~ 2 nm. În interiorul ei se găsește genomul viral format din ARN m.c. cu g.m. 2×10^6 dal (6 390 nucleotide), care are o așezare helicală cu o rază de ~ 4 nm, fiind inclavat între subunitățile proteice și formînd o helice dextrorsă cu aceeași înălțime ca și a acestora (fig. 15).

Întrucît fiecare tur de helice al moleculei de ARN are 49 de nucleotide, rezultă că fiecare subunitate de proteină este asociată cu trei nucleotide. În felul acesta, lungimea capsidei este determinată de lungimea ARN viral. Greutatea moleculară a virionului este de 39,2 $\times 10^6$.

Virusuri cu nucleocapsidă flexibilă

(Pl. 2,3)

Unele virusuri cu simetrie helicală au aspectul unor filamente flexibile și o structură tubulară mai laxă, datorită unor interacțiuni mai slabe între moleculele de proteină componente.

Virusul gălbenirii sfeclei de zahăr are o lungime de 600—2 000 nm și ∅ de 10 nm. Subunitățile proteice componente, de același tip (g.m. 23 000 dal), formează un filament tubular în mijlocul căruia se găsește genomul (ARN m.c. linear cu g.m. 2,3 — 4,3 $\times 10^6$ dal).

Fagii filamentoși flexibili, avînd ca prototip fagii fd, Pf1,Xf ș.a., au o structură similară și un genom ADN m.c.

Grupul Orthomyxovirus

Pl. 2,3

Avînd ca prototip virusul influenzei, agentul patogen al gripei umane, acest grup se prezintă sub formă de virioni sferici, în cazul tulpinilor adaptate la gazde de laborator, și predominant sub formă de filamente lungi, cînd este recent izolat de la om.

Virusul sferic are un ∅ de 100 nm și este alcătuit din mai multe fragmente de ribonucleoproteine dublu helicale, închise într-un înveliș extern lipoproteic, pe suprafața căruia se găsesc două tipuri de „spicule", corespunzînd *hemaglutininelor* și *neuraminidazelor* (fig. 16).

Genomul viral (g.m. 5 $\times 10^6$ dal) este alcătuit din 8 segmente separate de ARN m.c., cu lungimi diferite, fiecare segment conținînd informație genetică pentru codificarea uneia din cele 8 proteine identificate : polimerazele P3, P1, P2, HA (hemaglutinina), NP (nucleoproteina), NA (neuraminidaza), MP (proteina matricei) și NS (proteina nestructurală), în ordinea greutății lor moleculare descrescînde. Cele 8 segmente de ARN sînt asociate după un model regulat cu peste 1 000 molecule de proteină NP cu g.m. ~ 60 000 dal și cîteva molecule de proteine mari (g.m. ~ 80—100 000 dal).

Dintre proteinele mari (g.m. 80—100 000 dal), P1, P2 și P3), cea mai mare, *ARN-polimeraza dependentă de ARN*, este implicată în replicarea genomului viral, în timp ce celelalte (P2 și P3) participă în organizarea și asamblarea ribonucleoproteinei. Ansamblul ARN-proteine formează „complexul ribonucleoproteinic", care ocupă întreg interiorul particulei virale, formînd „corpul central" al virionului. Moleculele de ribonucleoproteine avînd dimensiuni corespunzătoare segmentelor de ARN echivalente sînt îndoite sub forma unui „ac de păr" și răsucite într-o dublă spirală, remarcabil de uniformă, cu ∅ de 15 nm, avînd o porțiune

monocatenară (cu ∅ de 7 nm) la una din extremități. Detaliile intime de asociere dintre ARN și proteine sînt pur speculative (Wrigley, 1979).

Prezența celor 8 segmente de ARN permite apariția de noi tulpini, în cursul infecțiilor mixte cu alte virusuri gripale, prin simpla reasortare a

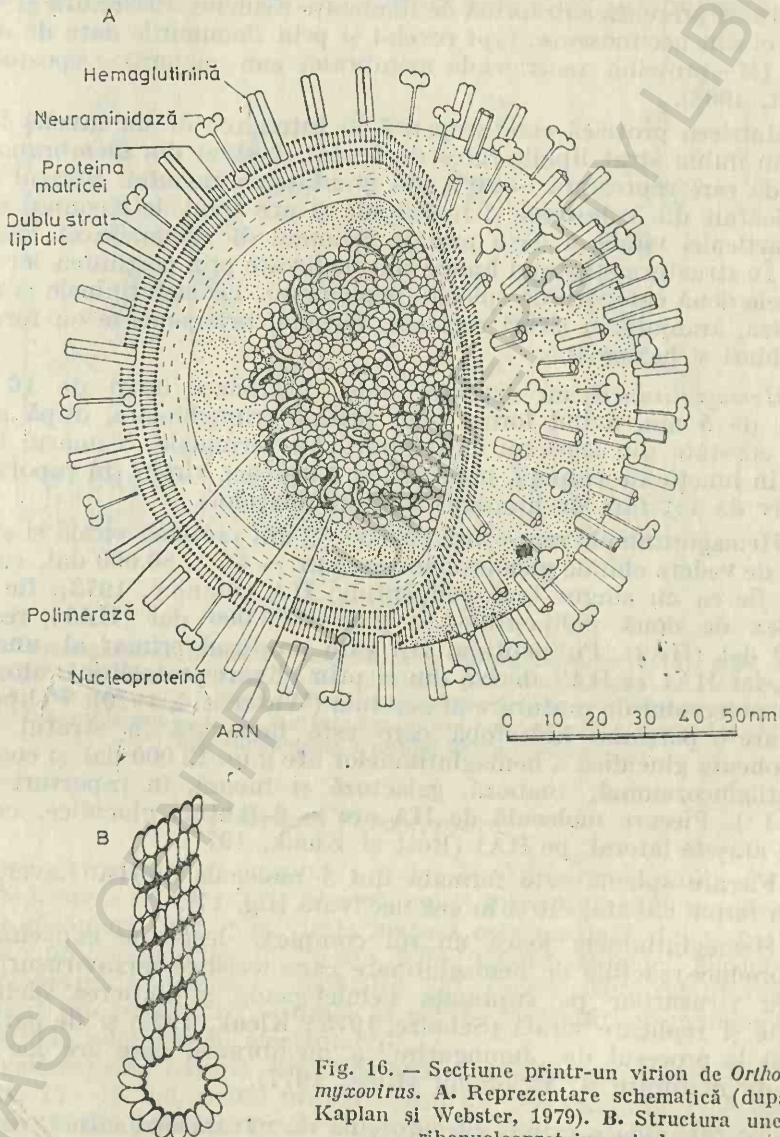


Fig. 16. — Secțiune printr-un virion de *Orthomyxovirus*. **A.** Reprezentare schematică (după Kaplan și Webster, 1979). **B.** Structura unei ribonucleoproteine virale.

unităților respective. Tulpinile noi sînt considerate de Burnet (1973) „pseudorecombinante" deoarece au genomuri pur și simplu „reasortate", pentru a le deosebi de tulpinile care rezultă din recombinări genetice efective (schimb de material genetic, pe bază de rupere și reunire de genomuri diferite).

Ansamblul corpului central viral este acoperit de un strat proteic *(matricea)*, gros de 6 nm, alcătuit din proteine M.

Proteina M are g.m. ∼ 25 000 dal, este abundentă (3 000 – 4 000 molecule/virion) și reprezintă ∼ 40% din g.m. a virionului. După unele imagini s-ar prezenta sub formă de filamente răsucite. Structura și semnificația ei sînt necunoscute, fapt revelat și prin denumirile date de diferiți autori (M—proteina matricei,de membrană sau majoră) (Apostolov și Flewett, 1968).

Matricea proteică este acoperită în întregime de un înveliș format dintr-un dublu strat lipidic (gros de 6 nm), derivat din membrana celulei-gazdă care reprezintă ∼ 20% din greutatea virionului. Stratul lipidic este alcătuit din colesterol și fosfolipide și are rolul de a conferi stabilitate particulei virale și de a proteja genomul de ribonuclează (Schulze, 1970). În structura stratului lipidic sînt inclavate prin porțiunea lor hidrofobă cele două categorii de spicule (peplomere), hemaglutininele și neuraminidaza, aranjate în șiruri regulate, formînd aranjamente cu formă de triunghiuri și hexagoane.

Hemaglutininele au aspectul unor bastonașe lungi de 16 nm și groase de 5 nm, avînd forma unor prisme triunghiulare, după cum se poate constata din aspectul extremității lor terminale. Numărul lor variază, în funcție de tulpină, între 500 și 1 000 per virion (în raport aproximativ de 5 :1 față de numărul neuraminidazelor).

Hemaglutininele reprezintă 25—35 % din proteina virală și sînt din punct de vedere chimic glicoproteine cu g.m. ∼ 75 — 80 000 dal, care pot exista fie ca un singur lanț polipeptidic HA (Stanley, 1973), fie ca un complex de două polipeptide cu g.m. ∼ 50 000 dal (HA1), respectiv 30 000 dal (HA2). Polipeptidul HA este produsul primar al unei gene virale, iar HA1 și HA2 derivă din el prin clivare proteolitică, ulterior, în cursul procesului de maturare al acestuia (Waterfield, 1979). Polipeptidul HA2 are o porțiune hidrofobă care este inclavată în stratul lipidic. Componenta glucidică a hemaglutininelor are g.m. 12 000 dal și constă din N-acetilglucozamină, manoză, galactoză și fucoză, în raporturi molare 6 :3 : 1 :1. Fiecare moleculă de HA are ∼ 6 lanțuri glucidice, cele mai multe atașate lateral pe HA1 (Rott și Klenk, 1977).

Fiecare spiculă este formată din 3 molecule de HA (Laver, 1973) atît în forma clivată, cît și în cea neclivată (fig. 17).

Hemaglutininele joacă un rol complex, legat de capacitatea lor de a produce reacțiile de hemaglutinare caracteristice mixovirusurilor, adsorbția virusurilor pe suprafața celulei-gazdă și inițierea ciclului de infecție și replicare virală (Schulze, 1975 ; Klenk, 1975) și de participare directă la procesul de „înmugurire" a membranei, care are loc în perioada de maturare a virionului (Rott, 1977).

Neuraminidaza este o glicoproteină de natură enzimatică, codificată de genomul viral, cu g.m. 60 000 dal (Gregoriades, 1972). Fiecare spiculă „*NA*" este formată din 4 subunități glicoproteice și are g.m. ∼ 240 000 dal (Wrigley, 1973). Are o formă de ciupercă cu capul alungit (8,5 × 5 nm) și un „picior" lung de 10 nm, terminat cu un „buton" cu ∅ de 4 nm. Numărul lor variază de la o tulpină la alta, fiind cuprins între 50 și

200 per virion. Fiecare neuraminidază este alcătuită din 4 molecule de glicoproteină (g.m. ~ 60 000 dal), fiecare monomer fiind, la rîndul său, alcătuit din două subunităţi puţin diferite, NA1 şi NA2, unite prin legături disulfidice.

Rolul biologic al neuraminidazelor este încă controversat (Rott, 1977).

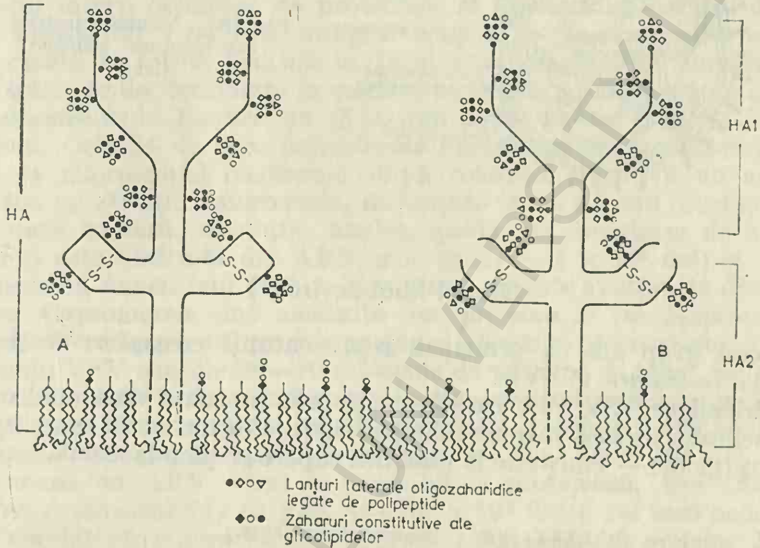


Fig. 17. — *Orthomyxovirus*. Structura moleculară a hemaglutininelor (HA), după modelul lui Klenk (1974). A. HA neclivată. B. HA clivată în glicoproteinele HA1 şi HA2. Porţiunea hidrofobă a HA2 interacţionează cu stratul dublu lipidic, din care este reprezentat numai stratul extern. Zaharurile sînt legate ca lanţuri oligozaharidice laterale pe polipeptid sau fac parte din glicolipidele stratului dublu lipidic.

Grupul Paramyxovirus

Virusul rujeolei aparţinînd genului *Morbillivirus* (familia *Paramyxoviridae*), are o formă relativ sferică, cu ∅ între 120 şi 170 nm, deşi este frecvent pleomorf. Particula virală matură este formată dintr-un înveliş extern lipoproteic gros de 10–20 nm, avînd scurte „spicule" glicoproteice şi o nucleocapsidă internă helicală (fig. 18). Virionii sînt relativ instabili şi îşi pierd integritatea structurală în cursul prelucrărilor premergătoare examinării la microscopul electronic.

Nucleocapsida lineară, helicală, apare ca o panglică răsucită, cu ∅ extern de 17–18 nm, avînd un canal central gol, cu ∅ de ~ 5 nm. Ea este alcătuită din genomul viral sub formă de ARN m.c. cu g.m. ~ 6.2×10^6 (52S) şi din 6 tipuri diferite de proteine cu g.m. variabile între 38 000 dal şi 79 000 dal. Cea mai mică proteină (g.m. ~ 38 000 dal) este analogă *proteinei M* de la *Myxovirus* şi este aşezată sub stratul dublu lipidic al învelişului viral. Ea are probabil un rol important în menţinerea integrităţii virionului.

Datorită structurii învelişului său extern, virusul rujeolei are activitate hemaglutinantă, hemolitică şi de fuziune celulară (formare de sinciţii — Morgan şi Rapp, 1977).

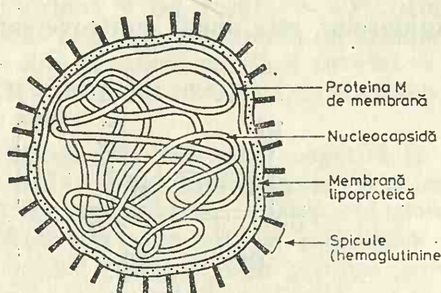


Fig. 18. — Virusul rujeolei — reprezentare schematică.

Grupul Rhabdovirus *)

Acest grup are ca principali reprezentanţi *virusul rabic* şi *virusul stomatitei veziculare* (VSV).

Virionii de VSV sînt caracterizaţi prin prezenţa unei nucleocapside dublu helicale, închisă într-un cilindru rigid (170 nm × 70 nm), în formă de cartuş (glonţ) — emisferic la unul din capete şi plan la celălalt (fig. 19).

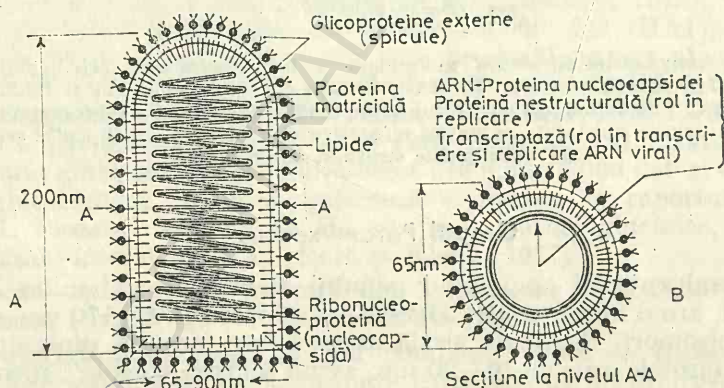


Fig. 19. — *Rhabdovirus.* Model de structură al virusului stomatitei veziculare. A. Secţiune longitudinală. B. Secţiune transversală.

Suprafaţa virionului este acoperită de două învelişuri suprapuse, unul intern proteic, alcătuit din *proteine M*, şi altul extern dublu lipidic. În stratul lipidic, provenit din membrana plasmatică a celulei-gazdă, sînt inclavate „spiculele" de natură glicoproteică (G), avînd forma unor butoni cu interiorul gol, situaţi la capătul unor pedunculi cu lungimea de 10 nm.

*) (gr. *rhabdos* = baston).

Ele reprezintă *hemaglutininele* virale (Wagner, 1972). Proteinele G sînt glicoproteine de membrană (g.m. ~ 69 000 dal) alcătuite din ~ 550 AA și două lanțuri laterale glucidice. Ele sînt inclavate în dublul strat lipidic al învelișului viral, avînd un capăt de ~ 30 AA, care proemineaza pe partea internă, iar restul, ca și componentele glucidice, sînt expuse pe partea externă a membranei, apărînd la microscopul electronic sub forma unor „proiecții" sau spicule pe suprafața virionului.

Spațiul intern delimitat de proteinele M asociate cu stratul dublu lipidic al învelișului viral este integral ocupat de *nucleocapsida virală*, care este rulată în formă helicală în jurul unui canal axial, formînd 30 tururi de spiră, egale, terminate la capătul emisferic cu încă 4 ture cu dimensiuni descrescînde. Ea are un ∅ extern de ~ 49 nm și un ∅ intern de ~ 29 nm. Cele 34 de ture paralele ale nucleocapsidei dau interiorului virionului la microscopul electronic după colorație negativă un aspect caracteristic, cu striații transversale, distanțate la ~ 4,5 nm (Cartwright, 1972).În stare extinsă, derulată, nucleocapsida are lungimea de 3,4 — — 4,0 μm și este alcătuită din ARN m.c. (g.m. ~ 4×10^6 dal) și 1 000 de capsomere cu dimensiuni de $9 \times 3 \times 3$ nm, așezate spațiat, la distanțe de 3,5 nm. Capsomerele sînt alcătuite din *proteina N* (nucleoproteina), care reprezintă componentul proteic major al virusului (Cartwright, 1972).

Virionul VSV conține 20—50 molecule de *proteine L* (engl. = *large*) cu g.m. ~ 150×10^3 dal, avînd rolul de *transcriptază* (enzimă necesară pentru replicarea și transcrierea genomului viral), 1 000 — 2 000 molecule de *proteină N (de nucleocapsidă)* cu g.m. ~ $50 - 62 \times 10^3$ dal, care interacționează cu ARN viral și probabil îl protejează, 100—300 de *proteine NS (nestructurale)* cu g.m. $40-50 \times 10^3$ dal și rol încă nedefinit (probabil corelat cu replicarea ARN viral), 1 600 — 4 000 *proteine M* cu g.m. ~ $20 - 30 \times 10^3$ dal asociate cu stratul lipidic al învelișului viral și 500—1 500 molecule de *glicoproteine* (g.m. ~ 70×10^3 dal) care proemineaza pe suprafața virionului, formînd spiculele.

Virusul rabic are o structură similară VSV, fiind alcătuit dintr-o nucleocapsidă monocatenară dextrorsă (Sokol, 1969) care conține ARN legat de două tipuri diferite de proteine, N și NS, așezată în partea centrală a particulei virale în formă de cartuș. Nucleocapsida are 28 ± 2 ture de spire mari egale și 5 ture cu diametru descrescînd (fig. 20).

Genomul, alcătuit din ARN m.c., este acoperit de ~ 1 700 molecule de proteină N (cu dimensiuni de $3 \times 5 \times 2{,}5$ nm) și de proteina minoră NS, a cărei așezare și număr sînt necunoscute.

Învelișul lipoproteic are o grosime de 7,5 — 10,0 nm și conține fosfolipide (65 000 molecule/virion), glicolipide (21 000), colesterol (55 000), glicerofosfolipide (46 000), sfingolipide (36 000) și 4 200 molecule de proteine aparținînd tipurilor de *proteine de membrană* (M1 și M2). Proteinele M2 au funcția de a lega nucleocapsida de dublul strat lipidic al învelișului viral. Moleculele de proteină M1 (mai mari) sînt asociate în foița internă a dublului strat lipidic și sînt localizate în mijlocul unor hexagoane formate din 6 molecule de glicoproteine.

Pe suprafața învelișului viral se găsesc numeroase spicule, fiecare reprezentînd o moleculă de glicoproteină, aranjate după o simetrie hexagonală și inclavate prin baza lor în dublul strat lipidic pe o adîncime de

2,5—5,0 nm (Schneider și Diringer, 1976). Numărul moleculelor de glicoproteine este egal cu al proteinelor M2 și N, deoarece examinînd virionul, de la suprafață spre interior, fiecare moleculă de glicoproteină este urmată de stratul lipidic; o moleculă de proteină M2 și o moleculă de nucleoproteină N. Extremitatea rotunjită a virionului (vîrful „cartușului") este alcătuit din pentamere, în loc de hexamere (Vernon, 1972).

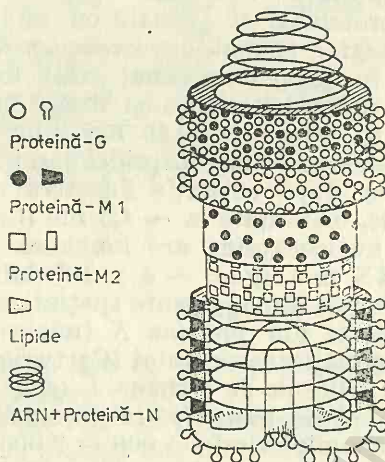


Fig. 20. — *Rhabdovirus*. Model de structură al virusului rabic (după Vernon și colab., 1976).

2) Virusurile cu simetrie icozaedrică

(Pl. 4,5,6)

Cercetările de microscopie electronică au arătat că virusurile descrise ca „sferice" (izodiametrice) au în realitate un contur hexagonal datorită capsidei lor poliedrice constituită dintr-o proteină cu un înalt grad de organizare. Studiile de chimie asupra unor virusuri sferice mici fitopatogene au confirmat supoziția după care capsida lor ar fi formată din molecule identice de proteină. În schimb, cercetările de microscopie electronică pe particule virale din grupa virusurilor sferice nu au adeverit deducțiile teoretice ale lui Crick și Watson (1956), care considerau că învelișul acestor virioni ar fi obligatoriu alcătuit din 60 (sau multiplu de 60) de unități asimetrice situate în jurul axelor de simetrie. Virionii sferici sînt într-adevăr constituiți din structuri asimetrice așezate în jurul axelor de simetrie, dar numărul acestor structuri este diferit de 60 sau multiplu de 60.

Explicația divergențelor relativ la structura virusurilor sferice rezidă în faptul că, spre deosebire de VMT, la aceste virusuri unitățile morfologice vizibile la microscopul electronic — capsomerele — nu sînt echivalente cu subunitățile chimice de construcție, ci sînt alcătuite fiecare din cîte 5 sau 6 subunități chimice. Ca urmare, regiunile din jurul fiecărei subunități și legăturile cu vecinele sale nu sînt exact identice, ci *aproximativ echivalente* sau cvasiechivalente (Caspar și Klug, 1962).

Conturul hexagonal foarte regulat al virusurilor sferice, așa cum apare la microscopul electronic, sugerează ideea că forma lor ar fi apropiată de aceea a unui solid cu toate fețele identice, cu laturile și unghiurile

egale (fig. 21). Din cele 5 solide euclidiene care răspund acestor condiţii şi anume *tetraedrul*, *cubul*, *octaedrul*, *dodecaedrul* şi *icozaedrul*, cel din urmă dă un profil hexagonal în cele mai multe orientări. În sprijinul concepţiei că virusurile sferice ar avea acest tip de simetrie, pledează datele lui Williams şi Smith (1958), care au demonstrat că umbrele proiectate de un icozaedru pe suprafaţa plană pe care este aşezat corespund

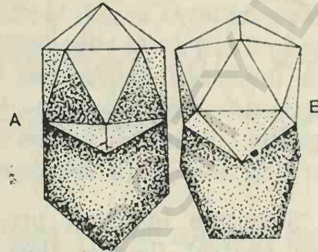


Fig. 21. — Reprezentarea schematică a formei umbrelor date de două modele icozaedrice iluminate sub un unghi de 35°. A. Icozaedru iluminat pe un vîrf. B. Icozaedru iluminat pe o muchie.

exact imaginii electronice a virusului *Tipula iridescent* (patogen pentru larvele mai multor specii de insecte) umbrit prin metalizare. Ulterior, simetria icozaedrică a fost pusă în evidenţă şi la alte virusuri, ca virusul nanismului tomatelor („Bushy stunt"), adenovirusuri, virusul polio, virusul herpesului etc. Acestea nu au în mod obligatoriu aspectul exterior al unui icozaedru cu feţe triunghiulare plane; feţele lor pot fi convexe sau chiar concave, în diferite grade. Cînd toate capsomerele sînt aşezate la distanţe radiare egale de centrul particulei rezultă practic o „cutie" sferică cu simetria 5 :3 :2, ca în cazul virusului mozaicului galben al napului (Mattern, 1977).

Icozaedrul este un poliedru platonician solid, regulat, avînd 20 de feţe, toate triunghiuri echilaterale, 30 de muchii sau creste şi 12 vîrfuri (vertexuri). În fiecare vîrf se întîlnesc 5 feţe ale poliedrului. El prezintă cel mai înalt tip de simetrie — caracterizat ca fiind de tip 5 :3 :2, întrucît are :

a) 6 axe de simetrie rotaţională de *ordinul 5*, reunind două vîrfuri opuse ale icozaedrului. Dacă modelul este privit de-a lungul uneia dintre axe în jurul căreia este rotat, există 5 poziţii în care are un aspect identic (o rotaţie de $\frac{2\pi}{5}$ în jurul axului de ordinul 5 face ca figura să coincidă cu ea însăşi) ;

b) 10 axe de *ordinul 3* reunind centrii a două feţe triunghiulare opuse (o rotaţie de $\frac{2\pi}{3}$ în jurul oricăruia din aceste axe dă un aspect identic — deci, privit de-a lungul acestor axe, solidul are un aspect identic în 3 poziţii) ;

c) 15 axe de simetrie rotaţională de *tip 2*, reunind mijlocul a două creste (muchii) opuse. Privit de-a lungul lor poliedrul are un aspect identic în două poziţii (corespunzînd unei rotaţii de $\frac{2\pi}{2}$ în jurul axului (fig. 22).

Virusurile „sferice" prezintă şi ele o simetrie de ordinul 5 :3 :2, pentru că părţile lor constituente — capsomerele — stau pe/sau în jurul axelor de simetrie de tip 5 :3 :2 ale unui icozaedru. Pentru înţelegerea acestei simetrii amintim următoarele exemple observate frecvent: a) simetria de ordinul 5 este cea mai frecventă la flori. Astfel, florile de măr,

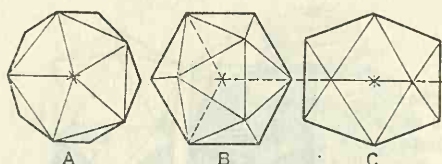


Fig. 22. — Axele de simetric ale unui icozaedru regulat. A. Axe de simetrie de tip 5. B. Axe de simetrie de tip 3. C. Axul de simetrie de tip 2.

care au 5 petale identice, prezintă un ax de simetrie de *tip 5*, care trece prin centrul fiecărei flori. Dacă floarea este privită de-a lungul acestui ax şi este rotită în jurul lui există 5 poziţii în care ea are un aspect identic (acest tip de simetrie este întîlnit destul de des şi la unele animale inferioare); b) tripiedul unui aparat fotografic are un ax de simetrie de *tip 3*, care trece prin punctul de joncţiune al celor 3 picioare aşezate simetric; c) o scară în formă de spirală prezintă o simetrie rotaţională

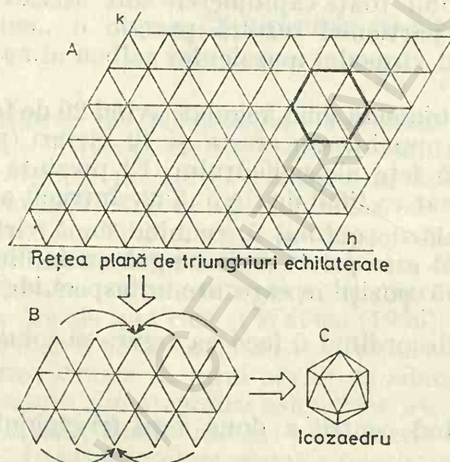


Fig. 23. — Construcţia unui icozaedru (C) prin plierea unei reţele plane de triunghiuri echilaterale egale (izometrice) (A), utilizînd douăzeci de triunghiuri (B). Săgeţile simple indică direcţia în care se face apropierea vertexurilor. Traseul liniilor delimitante indică modul de pliere a reţelei.

de *tip 2* în jurul axului său central, corespunzînd simetriei helicale (spiralate), prin faptul că fiecare treaptă are o relaţie constantă cu vecinele ei.

Un model icozaedric poate fi construit uşor prin plierea, secţionarea şi lipirea corespunzătoare a unui carton suplu pe care s-a desemnat în prealabil o reţea izometrică, formată din triunghiuri echilaterale identice, grupate într-o reţea hexagonală regulată (Caspar şi Klug, 1962). O astfel de reţea are axele *h* şi *k* înclinate la 60° (fig. 23 A).

Selecţia unui vîrf (vertex) al unui triunghi la originea reţelei ($h = 0$, $k = 0$) şi a unui al doilea vertex la punctul 1,0 delimitează un triunghi care va forma faţa caracteristică a unui icozaedru obţinut prin plierea a 20 de unităţi triunghiulare de acest tip (fig. 23B). În acest caz, vîrfurile feţelor triunghiulare ale icozaedrului vor coincide cu vîrfurile icozaedrului, care sînt numite I-vertexuri, pentru a evita confundarea lor cu vertexurile triunghiurilor. În realitate, cum am arătat, vertexurile feţelor triunghiulare determină vertexurile icozaedrului. Al doilea I-vertex poate fi ales în orice punct (h, k) pe reţeaua triunghiulară, ceea ce va produce un număr infinit de structuri diferite cu simetrie icozaedrică (de tipul 5 :3 :2) şi care sînt numite corect *deltaedre*. Faţa „icozaedrică" caracteristică a fiecărui deltaedru va conţine un număr variabil de unităţi triunghiulare, numărul respectiv fiind cunoscut sub denumirea de *număr de triangulare* (*T*)*).

De la acest model simplu de structură se pot construi un număr imens de sisteme, prin subdivizarea triunghiurilor în triunghiuri mai mici, obţinînd subunităţi de structură cu g.m. (volum) comparabil, virusurile cu dimensiuni foarte diferite.

Fig. 24 ilustrează această posibilitate, avînd ca punct de plecare reţeaua plană, formată din triunghiuri echilaterale egale, care au servit

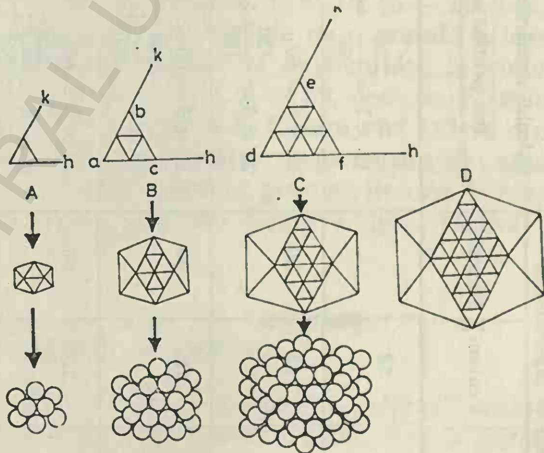


Fig. 24. — Semnificaţia numărului de triangulare (T). Sus: Triangularea feţei unui icozaedru cu k = 0, iar h variabil, avînd valori de 1 (A), 2 (B) şi 3(C). Mijloc: Modelele icozaedrice respective, avînd T = 1,4 şi 9; în D, icozaedrul cu T = 16. Jos: Modele de structură corespunzînd virusurilor icozaedrice respective (după Mattern, 1977).

*) Caspar şi Klug (1962) au demonstrat că numărul capsomerelor şi al unităţilor de structură poate fi corelat cu numărul de triangulare. Tabelul nr. 2 arată această relaţie fundamentală aplicată la o serie de virusuri icozaedrice cu „T" progresiv crescînd. În toate cazurile, numărul capsomerelor pentagonale este fix (12), ca şi localizarea lor, la apexurile oricărei capside icozaedrice, în timp ce numărul capsomerelor hexagonale, localizate pe feţele şi muchiile icozaedrului, este variabil. Datorită distribuţiei regulate pentagonale şi hexagonale, „T" poate fi determinat în funcţie de numărul subunităţilor de structură ale capsomerelor, după formula: (Numărul capsomerelor pentagonale × 5) + (numărul capsomerelor hexagonale × 6): 60. Numărul obţinut (1, 3, 4, 7...) reprezintă numărul de triangulare T utilizat pentru a indica tipul de structură al virusurilor icozaedrice.

Tabelul nr. 2

Relațiile dintre structura moleculară a unor virusuri icozaedrice și numărul de triangulare

Virusul	Numărul capsomerelor			Calculul numărului de triangulare $T = \frac{(\text{nr. pentoni} \times 5) + (\text{nr. hexoni} \times 6)}{60}$	Nr. de triangulare	Caracteristici
	Total*)	Pentoni	Hexoni			
Fag Φ X 174	12	12	—	$12 \times 5 = \frac{60}{60} = 1$	T = 1	Virus icozaedric simplu. Toate capsomerele ocupă poziții echivalente.
Virusul mozaicului galben al napului.	32	12	20	$12 \times 5 = 60$ $20 \times 6 = \frac{120}{180}; \frac{180}{60} = 3$	T = 3	Virusuri cu structură mai complexă. Capsomerele situate la vîrfurile icozaedrului sînt *pentoni* (pentamere), iar cele de pe fețe sînt *hexoni* (hexamere).
Nudarelia capensis	42	12	30	$12 \times 5 = 60$ $30 \times 6 = \frac{180}{240}; \frac{240}{60} = 4$	T = 4	
Polioma-papilom	72	12	60	$12 \times 5 = 60$ $60 \times 6 = \frac{360}{420}; \frac{420}{60} = 7$	T = 7	
Reovirus	92	12	80	$12 \times 5 = 60$ $80 \times 6 = \frac{480}{540}; \frac{540}{60} = 9$	T = 9	
Herpesvirus	162	12	150	$12 \times 5 = 60$ $150 \times 6 = \frac{900}{960}; \frac{960}{60} = 16$	T = 16	
Adenovirus	252	12	240	$12 \times 5 = 60$ $240 \times 6 = \frac{1440}{1500}; \frac{1500}{60} = 25$	T = 25	

*) Este corelat cu numărul de fațete ale icozaedrului, după formula : nr. total capsomere = 10 T + 2

pentru construcţia modelului unui icozaedru. Pornind de la această reţea, Caspar şi Klug (1962) au subdivizat triunghiurile componente în triunghiuri mai mici, la vîrful cărora se vor grupa ulterior capsomerele. În acest scop au ales, în toate cazurile, coordonata $k = 0$ şi valorile 1, 2 şi 3 pentru coordonata *h*. Se obţin astfel triunghiul de bază A ($h = 1$) cu numărul de triangulare $T = 1$ ($T = h^2$) şi 12 capsomere ($C = 10\,T + 2$), triunghiul B ($h = 2$) cu $T = 4$ (1×2^2) şi 42 de capsomere şi triunghiul C ($h = 3$) cu $T = 9$ (1×3^3) şi 92 de capsomere (tabelul nr. 2). Fig. 24 D reprezintă un model icozaedric cu $T = 16$. În ansamblu, figura evidenţiază semnificaţia numărului de triangulare (T) în construcţia icozaedrelor (Mattern, 1977) : prin triangularea succesivă a feţelor icozaedrului se pot mări numărul unităţilor de construcţie şi, în consecinţă, dimensiunile virusului. Acest mod de construcţie nu se abate de la principiul cvasiechivalenţei, deşi pentonii suferă o deformare mai mare în spaţiu pentru a satisface exigenţele poziţiei lor la vîrfurile icozaedrului, în raport cu hexonii situaţi pe feţele şi muchiile icozaedrului. Cel mai adesea, capsomerele sînt aşezate pe icozaedru în felul următor : capsomerele formate din 5 unităţi de structură (pentamere sau pentoni) la fiecare vîrf al icozaedrului ; capsomerele formate din 6 unităţi de structură (hexamere sau hexoni), pe crestele (muchiile) sau pe muchiile şi feţele icozaedrului.

Au fost propuse mai multe formule pentru *calcularea numărului capsomerelor*. După Horne (1962), pentru virusurile icozaedrice, numărul total al capsomerelor (N) este dat de formula $N = 10\,(n - 1)^2 + 2$, în care *n* este numărul total al capsomerelor vizibile pe o creastă a icozaedrului, inclusiv cele două capsomere situate la extremităţi, la vîrfurile care limitează creasta. În cazul în care $n = 2$, $N = 32$, ceea ce corespunde structurii poliovirusului care are o capsomeră la fiecare vîrf (12) şi o capsomeră în centrul fiecărei feţe (20). Cînd unităţile de structură sînt aşezate în jurul vîrfurilor icozaedrului, ele formează 12 grupuri de cîte 5 subunităţi, ceea ce corespunde unui virus izometric foarte simplu, alcătuit din 60 de unităţi de structură.

Probleme legate de modul de construcţie al virionilor icozaedrici

Descoperirea simetriei icozaedrice a virionilor „sferici" ridică o serie de probleme privind modul în care poate fi construită o astfel de structură. În legătură cu aceasta s-au făcut o serie de ipoteze, fără ca pînă astăzi să se fi ajuns la o concepţie unitară.

Microscopia electronică a confirmat în cazul virusurilor din această categorie existenţa a două tipuri de capsomere avînd 5 şi 6 laturi (pentoni şi hexoni), rezultînd, la rîndul lor, din aranjarea simetrică a unor subunităţi de construcţie mai mici. Problema construcţiei particulei virale constă deci în a identifica modul în care capsomerele de formă penta- şi hexagramică se pot aranja simetric pentru a acoperi o suprafaţă închisă, alcătuind un fel de cutie icozaedrică.

Încercînd să explice această construcţie, Caspar şi Klug (1962) au recurs la unul din principiile de geometrie aplicate de arhitectul Buckminster Fuller în construcţia domului geodezic (fig. 25). În proiectul de plan (realizat în construcţie), pentru cupola domului, Fuller a făcut o subdiviziune a suprafeţei unei sfere în faţete triunghiulare echilaterale, în

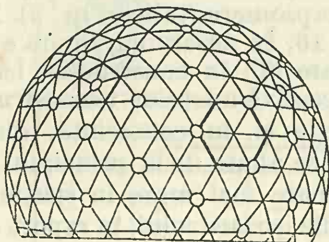


Fig. 25. — Reprezentarea schematică a domului geodezic al lui Fuller. Suprafaţa este alcătuită din faţete triunghiulare cvasiechivalente, grupate în hexamere sau pentamere în jurul unor suprafeţe circulare mici.

raporturi cvasiechivalente, aranjate după o simetrie icozaedrică. Acest mecanism este uşor explicabil dacă, utilizînd reţeaua hexagonală plană folosită pentru construcţia icozaedrului, anumite „noduri" de ordinul 6 ale reţelei sînt păstrate, iar 12 dintre ele sînt transformate în „noduri" de ordinul 5.

În cazul virionilor, elementele de structură astfel aşezate nu vor mai fi toate în poziţii echivalente, dar distorsiunea introdusă va fi slabă şi cu atît mai uşor de suportat cu cît moleculele de proteine sînt destul de mari şi de elastice. Singura condiţie pentru menţinerea stabilităţii acestei structuri este ca unităţile proteice de structură să conţină regiuni de interacţiune, dispuse într-un mod foarte asemănător. Acest procedeu de triangulare a sferei oferă dispozitivul optim pentru formarea unei cutii închise, construită din unităţi din structură identice, legate în mod regulat. Un grad comparabil de cvasiechivalenţe nu poate fi realizat prin nici un alt model de subdivizare a suprafeţei unei sfere, deoarece duce la tensiuni net mai mari.

În ipoteza lui Caspar şi Klug (1962) se consideră că acest dispozitiv de construcţie a învelişului proteic al virionului este determinat de proprietăţile de legare specifică ale unităţilor moleculare identice din care acesta este construit. Aşezarea regulată rezultă din faptul că unităţile de structură se leagă în mod specific şi de aceea sînt asociate în mod regulat, ceea ce determină formarea unei structuri stabile. Legarea specifică a unor unităţi identice duce la formarea unei structuri simetrice, deoarece există numai un număr limitat de căi în care o anumită unitate poate fi legată cu vecinele sale pentru a forma un număr maxim de legături stabile. Cea mai simplă situaţie este aceea întîlnită la cristale, care apar ca o reţea periodic tridimensională, în care fiecare unitate este în raporturi echivalente cu vecinele sale. În cazul particulelor virale, toate moleculele, deşi identice, nu sînt în raporturi exact echivalente, ci numai aproximativ echivalente sau cvasiechivalente.

Bazat în mare parte pe concepţia lui Caspar şi Klug (1962), Kellenberger (1962) consideră că subunităţile identice legate între ele în poziţii specifice pentru a reconstrui un icozaedru trebuie obligatoriu să fie aşezate după un model regulat, care poate fi asemănat cu suprafaţa unui cristal. El consideră că subunităţile de construcţie — reprezentate în figura 26

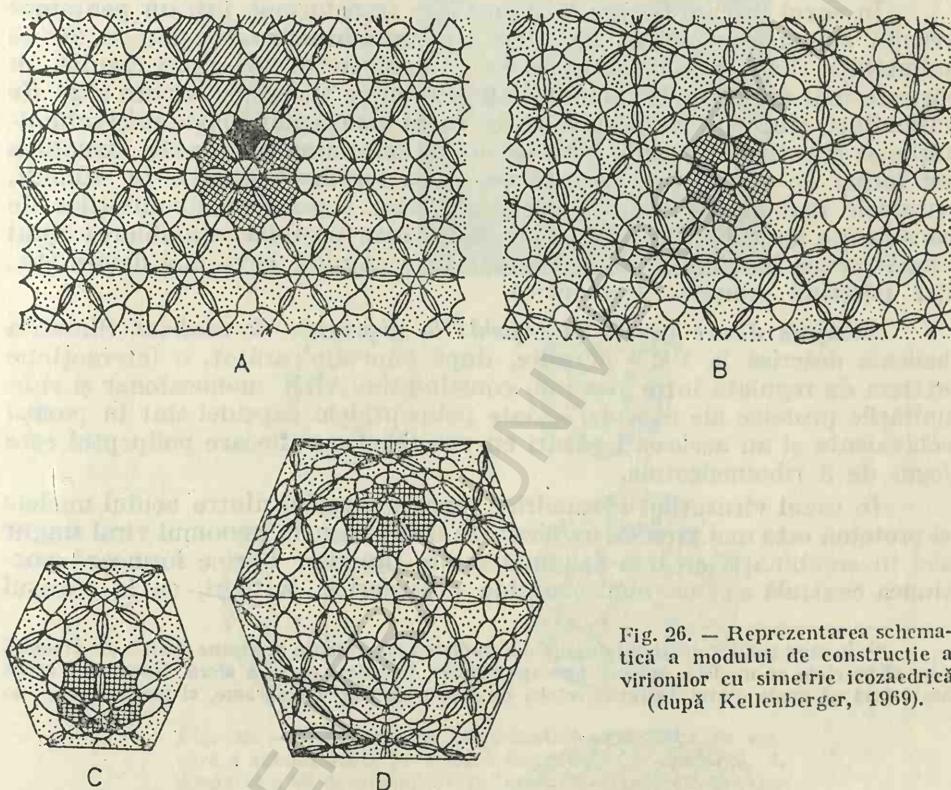


Fig. 26. — Reprezentarea schematică a modului de construcţie a virionilor cu simetrie icozaedrică (după Kellenberger, 1969).

A. Construcţia capsidei virale poate fi reprezentată schematic ca provenind dintr-o reţea hexagonală formată din grupuri din cîte 6 subunităţi de construcţie (hexamere). B. Îndepărtarea unui sector de 60° din această reţea, urmată de reunirea marginilor rămase libere, duce la formarea unui con, în vîrful căruia un hexamer este înlocuit cu un pentamer. C. Dacă fiecare hexamer este transformat într-un pentamer rezultă un icozaedru regulat format din 60 subunităţi de construcţie, reprezentînd capsida virală cea mai mică ce poate fi construită după acest model. D. Capsidă virală formată din 180 subunităţi de construcţie, alcătuită pe acelaşi principiu, dar avînd în structură, pe lîngă pentamere, şi 20 de hexamere.

cu o formă arbitrară — ar forma o reţea hexagonală în care se deosebesc unităţi de construcţie dispuse în grupuri de cîte 6 (hexamere) şi cîte 3 (trimere). Dacă presupunem că dintr-un astfel de model regulat se scoate un sector de 60°, marginile rămase libere se apropie şi se unesc (pentru că

se potrivesc una cu alta exact ca înainte), formînd un con al cărui vertex, un hexamer, a fost înlocuit cu un pentamer*).

Pentru ansamblul icozaedrului rezultă două tipuri de desene: unul hexagonal, corespunzînd unităților plasate pe fețe și pe muchiile triunghiurilor — care sînt situate la distanță egală de 6 obiecte vecine — și unul pentagonal, corespunzînd celor așezate la vîrfuri, care sînt echidistante numai față de 5 obiecte înconjurătoare (fig. 28).

În cazul în care fiecare hexamer este transformat într-un pentamer rezultă cel mai mic virus de acest tip, un icozaedru regulat cu 60 de subunități. Cînd transformarea se face numai în 10 localizări rezultă un virus format din 20 de hexamere și 10 pentamere situate la vîrfuri (120 de subunități) (fig. 29). Se admite că în cazul virusurilor foarte mici subunitățile ar fi astfel construite încît ar putea determina prin însăși structura lor forma de asamblare necesară pentru a forma o capsidă. În schimb, capsidele mai mari nu sînt perfect simetrice. Așezarea subunităților de construcție în raporturi cvasiechivalente face posibilă asamblarea unui număr redus de subunități mai mari într-o capsidă ceva mai deformată, dar păstrînd simetria icozaedrică.

Relațiile dintre genom și capsidă la virusurile icozaedrice. Simetria helicală descrisă la VMT permite, după cum am arătat, o interacțiune extrem de regulată între genomul constînd din ARN monocatenar și subunitățile proteice ale capsidei: toate polipeptidele capsidei sînt în poziții echivalente și au aceleași legături cu vecinele lor și fiecare polipeptid este legat de 3 ribonucleotide.

În cazul virusurilor icozaedrice raportul spațial dintre acidul nucleic și proteină este mai greu de explicat. În unele cazuri, genomul viral singur sau în combinație cu una sau mai multe proteine bazice formează porțiunea centrală a unei nucleocapside cvasisferice. Alteori, ca la virusul

*) În mod similar, scheletul de siliciu al radiolarului *Aulonia hexagona* descris de Haeckel pare să prezinte un model hexagonal aproape regulat, îmbrăcat peste o sferă. Examenul atent arată însă că unele dintre ochiurile rețelei de siliciu nu sînt hexagrame, ci pentagrame. În

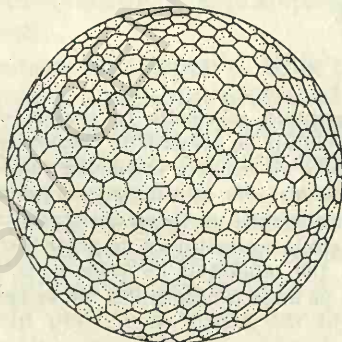


Fig. 27. — Scheletul de siliciu al radiolarului *Aulonia hexagona* avînd aspectul unui model hexagonal îmbrăcat peste o sferă. Printre ochiurile hexagonale ale rețelei sînt intercalate pentagoane, în lipsa cărora o rețea hexagonală nu poate acoperi o sferă.

conformitate cu o formulă fundamentală a topologici (referitoare la partiția arbitrară a unei sfere în regiuni care se mărginesc una pe alta după anumite linii) este imposibil ca o rețea hexagonală să acopere o sferă. Nevoia de unități pentagonale pentru construcția unui înveliș închis este deci absolută (fig. 27).

herpes, genomul ADN este răsucit ca sîrma unei bobine electrice pe un mănunchi de proteine fibrilare *(structură toroidală)*. În alte cazuri, acidul nucleic viral poate fi aranjat în acord cu simetria icozaedrică a capsidei.

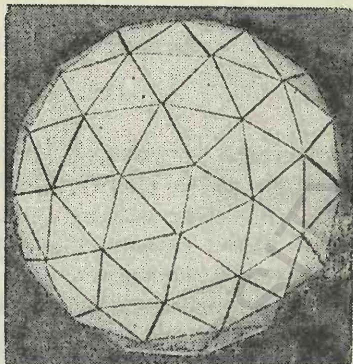


Fig. 28. — Reprezentarea unei rețele de suprafață icozaedrică pe o sferă geodezică, explicînd forma „sferică" a virusurilor cu acest tip de simetrie.

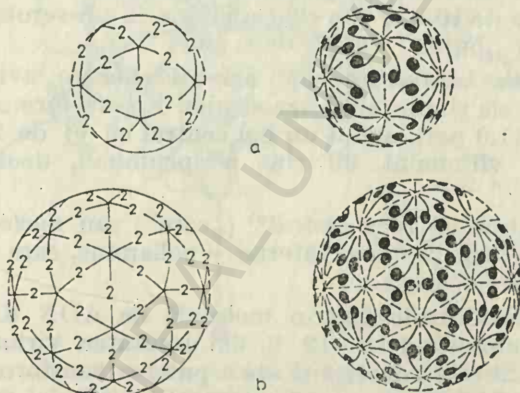


Fig. 29. — Reprezentarea diagramatică a modului de așezare a subunităților pe o rețea icozaedrică de suprafață. A. Așezarea a 60 de subunități (în formă de virgulă) într-o rețea în care T = 1. B. Așezarea a 180 de subunități într-o rețea cu T = 3 (după Harrison, 1981).

Acest mod de organizare implică existența unor interacțiuni puternice între proteinele capsidale, precum și între ele și genomul viral pentru a face ca organizarea lor să fie riguros geometrică (Lonberg-Holm, 1974).

Simetria icozaedrică prezintă avantaje importante din punct de vedere biologic evidențiate, în ultimă instanță, prin eficiența replicării virale. Virusurile icozaedrice pot fi asamblate cu o mai mare economie de proteine decît cele helicale: genomul ARN al virusului mozaicului galben al napului este acoperit de 180 de molecule de proteine dispus după o simetrie icozaedrică, în timp ce genomul VMT, avînd aceeași g.m., necesită 2 130 de molecule proteice. Alte avantaje sînt legate de ușurința de asamblare a particulei virale și mai ales de stabilitatea structurii care rezultă.

Virusurile icozaedrice au ca regulă generală un dezavantaj legat de sensibilitatea lor la enzimele nucleazice, mai mare decît aceea a virusurilor helicale (Crowther, 1971).

Grupul Adenovirus

(Pl. 4,5)

Adenovirusurile sînt virusuri cu structură izometrică, izolate inițial din țesutul amigdalian uman (Rowe, 1962).

Virionul este constituit dintr-o moleculă de ADN d.c. lungă de 12 μm, împachetată într-o capsidă izometrică cu ∅ 60—80 nm, formată din 252 de capsomere. Se deosebesc două tipuri de capsomere:

— *capsomerele pentamerice* sau *pentonii*, situate la cele 12 vîrfuri ale icozaedrului, au o structură mai complexă, fiind formate din două subunități structurale legate necovalent și anume: baza pentonului, inclavată în capsidă de care este legată o prelungire fină, fibra, avînd un ∅ de 2 nm și o lungime de 10—30 nm (variabilă de la un serotip la altul), care se termină cu un „buton" cu ∅ de 4 nm;

— *capsomerele hexamerice* sau *hexonii* (fiecare avînd 6 „vecini" similari) ocupă fețele și crestele icozaedrului. Ele au forma unor elipsoide prelungite (9,5 × 11,0 nm), avînd un gol central cu ∅ de 2,5 nm. Din cei 240 de hexoni ai virionului, 60 sînt peripentonali, deoarece înconjură pentonii.

Capsida conține un *corp central**) („core") sau *nucleoid* alcătuit din ADN viral, asociat cu proteine interne și poliamine, care au rolul de a-l menține în stare condensată.

Genomul este alcătuit dintr-o moleculă de ADN d.c. linear (g.m. 23 × 10^6 dal), reprezentînd 10—12 % din greutatea virionului (~ 35 000 perechi de baze). El este infecțios și are o putere transformantă, variabilă de la un virus la altul.

Adenovirusul conține cel puțin 12 tipuri de proteine structurale constitutive ale capsidei, diferite, cele principale intrînd în *structura hexonilor (proteina II), a bazei pentonilor (III), a fibrelor (IV)* sau ca *proteine interhexonale* sau *asociate hexonilor (VI, VIII și IX)*. Două

---

*) Termenul de corp central nu este utilizat totdeauna cu aceeași accepție biochimică și structurală.

La *Vaccina* și *Reovirus*, „corpul central" corespunde unei nucleocapside construită regulat. În cazul virusului vaccinal, peretele dublu stratificat al corpului central închide în interior genomul ADN, proteina genomului viral și o enzimă, ARN-polimeraza, dependentă de ADN, în timp ce la *Reovirus* are structura unui înveliș icozaedric, care conține 10 segmente de ADN d.c. și 4 polipeptide. La alte virusuri cu simetrie icozaedrică „corpul central" conține genomul și proteinele asociate cu el, fără să includă capsida. În cazul adenovirusurilor conține, pe lîngă ADN, două polipeptide necapsidale și poliamine care diminuă sarcina netă negativă, iar la *Papovavirus*, ADN și 3 polipeptide interne, dintre care două par să fie histone celulare.

La *Oncornavirus*, „corpul central" poate să conțină sau nu capsida simetrică, genomul ARN și proteinele interne.

Acest termen este folosit și în cazul unor virusuri cu simetrie helicală și înveliș extern pentru a desemna nucleocapsida care conține ARN, polipeptide capsidale („complexul ribonucleoproteinic") și mai multe proteine enzimatice (de exemplu, polimeraze).

proteine *(V* și *VII)* sînt „interne" fiind asociate cu ADN. Celelalte proteine au o localizare și un rol încă necunoscute (fig. 30).

Adenovirusurile sînt clasate în grupuri după specificitatea gazdei lor (umane, simiene, bovine, ovine, aviare etc.) și în serotipuri în funcție de structura lor antigenică. Adenovirusurile umane (H), care persistă

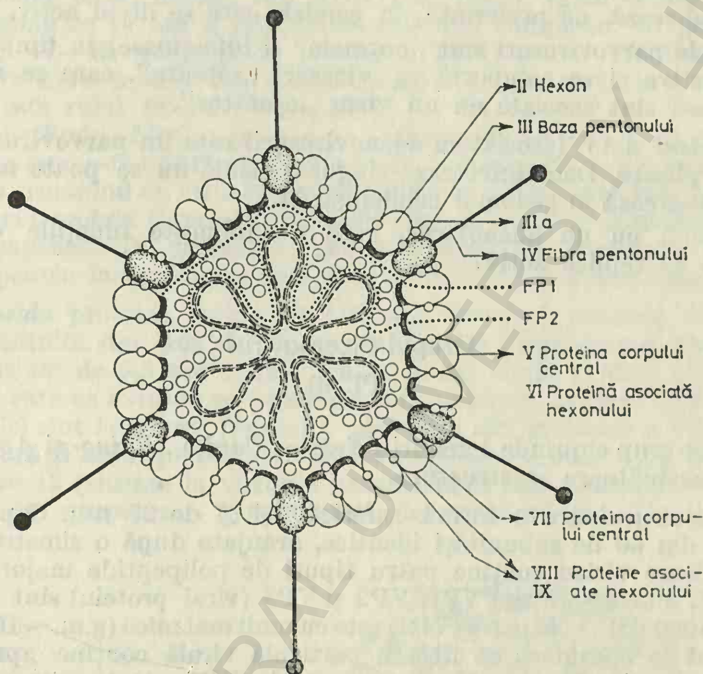


Fig. 30. — Model de structură a virionilor de *Adenovirus* tip 2, cu indicarea topografiei principalelor proteine structurale și a unor proteine minore (după Brown și colab., 1975).

frecvent în stare latentă în regiunea orofaringiană, pot produce faringite, bronhopneumopatii, enterite, conjunctivite etc. Adenovirusul H12 inoculat la hamsteri nou-născuți produce tumori (Trentin, 1962) și induce transformarea malignă *in vitro* a celulelor renale respective (McBride, 1964).

Grupul Parovirus *)

Acest grup cuprinde cele mai mici virusuri care infectează vertebratele (rozătoarele, caii, bovinele etc.).

Au o formă poliedrică, cu ∅ 18—26 nm și simetrie icozaedrică. Virionul izometric nud este alcătuit din 32 de capsomere cu ∅ ~3—4 nm, dintre care 12 sînt pentamere și sînt situate la vîrfurile icozaedrului și

*) l. *parvus* = mic.

20 sînt hexamere şi sînt dispuse pe feţele lui. Genomul este reprezentat de o moleculă unică, lineară, de ADN m.c. cu g.m. 1.2 – 1,8 $\times 10^6$ dal.

Replicarea parvovirusurilor are loc în nucleu unde proteinele virale se acumulează fie sub formă de structuri capsidale goale, fie ca virioni infecţioşi progeni (Matthews, 1979). Pentru multiplicare, membrii grupului *Parvovirus* au nevoie de o serie de funcţii celulare. De aceea, replicarea lor se realizează, de preferinţă, în celulele care se divid activ.

Unele parvovirusuri sînt „normale" şi infecţioase, în timp ce altele sînt defective şi se comportă ca virusuri „satelite", care se multiplică numai dacă sînt asociate cu un virus „ajutător".

Virusul AAV (asociat cu adenovirusuri) este un parvovirus defectiv pentru replicare. Dacă infectează singur o celulă nu se poate multiplica, dar se integrează în genomul celulei-gazdă.

Asociat cu un adenovirus, care îi supleneşte funcţiile defective, începe să se replice activ.

Grupul Picornavirus

(Pl. 6)

Acest grup cuprinde 4 genuri (*Entero-*, *Cardio-*, *Rhino-* şi *Aphtovirus*) foarte asemănătoare ca structură.

Poliovirusul are o formă „sferică" şi ∅ de 27 nm. Capsida este alcătuită din 60 de subunităţi identice, aranjate după o simetrie icozaedrică. Fiecare virion conţine patru tipuri de polipeptide majore, cu rol structural, dintre care trei VP1, VP2 şi VP3 (viral protein) sînt mai mari (g.m. ~30 000 dal), iar a patra (VP4) este cu mult mai mică (g.m. ~10 000 dal). În general se consideră că fiecare particulă virală conţine aproximativ 60 de copii din fiecare tip de polipeptid (VP1–4), la care se adaugă unele polipeptide minore cu rol necunoscut.

Genomul viral este alcătuit dintr-o moleculă unică de ARN m.c. cu g.m. 2 $\times 10^6$ dal, care conţine 7 500 nucleotide şi reprezintă 30% din greutatea virionului. În cursul biosintezei poliovirusului, întregul genom este tradus într-un polipeptid unic, imens (VP0), care apoi este clivat, înainte de a se termina sinteza în patru proteine mai mici (VP1–4).

Grupul Herpesvirus

(Pl. 6)

Aceste virusuri, răspîndite la toate vertebratele studiate pînă în prezent, produc la om infecţii latente persistente şi manifestări clinice ca, de exemplu, herpesul labial, gingivostomatite, keratite, encefalite şi malformaţii congenitale (subtipul I) sau cu localizări urogenitale (subtipul II). *Virusul Epstein-Barr* produce în Europa şi America de Nord *mononucleoza infecţioasă* şi este asociat cu neoplasmele de col uterin, în timp ce în Africa – în anumite regiuni tropicale – produce la copii

tumori ale maxilarului *(limfomul Burkitt)*. Cel mai studiat este virusul *Herpes simplex (tipul I, hominis)*.

Virionul de Herpes simplex are ∅ 140—170 nm și o structură complexă, alcătuită dintr-un *corpuscul central* acoperit de o capsidă proteică complexă și de învelișul viral extern (g.m. totală $> 1\,000 \times 10^6$ dal)

Genomul viral, format din ADN d.c. linear (g.m. $\sim 100 \cdot 10^6$ dal), are o lungime de 44 µm și este dintre cele mai complexe. El poate codifica între 47—49 polipeptide (Honess, 1974) și 100 (Watson, 1976), dintre care aproximativ 1/2 sînt nestructurale. În structura virionului, genomul este rulat în stare compactă, cu un spațiu de 4—5 nm în jurul unui cilindru fibrilar proteic cu ∅ intern de 18 nm și ∅ extern de 70 nm, așa cum este rulată sîrma pe o bobină electrică sau ața pe un mosor iar alteori semănînd cu structurile cunoscute în arhitectură sub denumirea de *structuri toroidale*. Capetele genomului sînt ancorate de suprafața internă a nucleocapsidei. În ansamblu, genomul legat de proteinele specifice, necesare pentru încapsidarea corectă a ADN, formează *nucleoidul*.

Capsida proteică, avînd ∅ 100 nm, prezintă simetrie icozaedrică și este alcătuită din 162 de capsomere, fiecare avînd forma unei prisme cu dimensiuni de 9,5 nm × 12,5 nm și cu un canal central axial gol cu ∅ 4 nm care se extinde pe jumătate din lungimea prismei. Dintre aceste prisme, 150 sînt *hexamere (hexoni)*, alcătuite din gruparea a 6 subunități de structură și apar pe secțiuni transversale sub forma unor hexagoane, în timp ce 12 (situate la vîrfurile icozaedrului) sînt *pentamere (pentoni)* rezultate din gruparea a 5 subunități de structură (fig. 31).

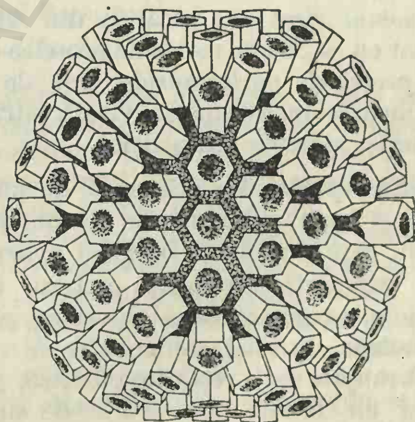


Fig. 31. — *Herpesvirus* — reprezentarea schematică a capsidei, văzută de-a lungul unuia dintre axele de simetrie de tip 2.

Învelișul extern, neregulat ca formă și mărime, are un ∅ de ~ 180—200 nm și conține lipide, polipeptide și cel puțin 13 glicoproteine așezate în două straturi suprapuse și anume: a) stratul său extern, de natură predominant lipidică, conține și unele proteine de natură virală sau provenite din celula-gazdă. Acest strat se formează pe suprafața virusului nou sintetizat cînd migrează din nucleul celulei-gazdă și este derivat în cea mai mare parte din membrana nucleară a celulei-gazdă,

modificată biochimic de infecție. Este necesar pentru infecțiozitatea virionului; b) stratul glicoproteic, situat imediat sub învelișul lipidic, este alcătuit din proteine legate covalent cu zaharuri aminate.

La virionii intacți care au fost recent eliberați din celule, învelișul extern formează o teacă strînsă în jurul capsidei, în timp ce la virionii mai vechi el devine mai larg, neregulat, și se separă de capsidă. În perioada mai tardivă a infecțiilor pot apărea virioni fără înveliș, probabil datorită ruperii structurii membranei nucleare sub acțiunea infecției virale. Nucleocapsida herpesvirusului se dezvoltă în nucleul celulei-gazdă și se maturează cînd trece prin membrana nucleară (Darlington, 1969).

Grupul Togavirus *)

Cele mai cunoscute virusuri din acest grup infectează în natură artropode hematofage pe vertebrate, de la care pot fi transmise prin înțepătură la alte animale și la om. Cunoscute sub denumirea de *arbovirusuri* (arthropode borne viruses), aceste virusuri, alcătuite din ARN, proteine, fosfolipide, colesterol și carbohidrați, sînt grupate în două genuri: *Alphavirus* (produc encefalite ecvine) și *Flavivirus* (produc febra galbenă, denga, encefalite de căpușe).

A l f a v i r u s u r i l e au un virion alcătuit dintr-o nucleocapsidă centrală înconjurată de un dublu strat lipidic, în afara căruia se găsesc glicoproteinele. Virionul are un ∅ global de 70 nm, o g.m. de $\sim 70 \times 10^6$ dal și un coeficient de sedimentare de 280 S.

Genomul viral este alcătuit din ARN m.c. cu g.m. $4,5 \times 10^6$ dal, complexat cu ~ 300 de molecule proteice de același tip (g.m. ~ 30 000 dal), numite *proteinele nucleocapsidei* sau ale *nucleoidului* viral, împreună cu care formează nucleocapsida virală, structură stabilă, cu formă sferică (∅ 30 nm) și simetrie icozaedrică.

Nucleocapsida este acoperită de un dublu strat lipidic format din colesterol și fosfolipide, gros de 4,8 nm și situat la 20—26 nm de centrul virionului, care reprezintă *învelișul extern* (sau „mantaua" virală).

Pe suprafața învelișului extern, inclavate în structura dublului strat lipidic, se găsesc două tipuri de *glicoproteine*, notate cu E1 și E2 (engl. *envelope*=înveliș), sau *proteine de membrană M*, cu g.m. ~ 50 000 dal. Ele sînt aranjate ca o rețea icozaedrică, probabil datorită faptului că prin porțiunea lor bazală sînt fixate de nucleocapsida icozaedrică, într-un raport de legare de 1 la 1 (Strauss și Strauss, 1978).

Nucleocapsida alfavirusurilor se formează în citoplasmă, de unde difuzează spre suprafața celulei unde interacționează cu glicoproteinele virale. Virionul este eliberat prin „înmugurire" prin membrana celulară modificată de infecția virală, formîndu-și astfel „mantaua" externă (fig. 32).

---

*) 1. *Toga* = manta.

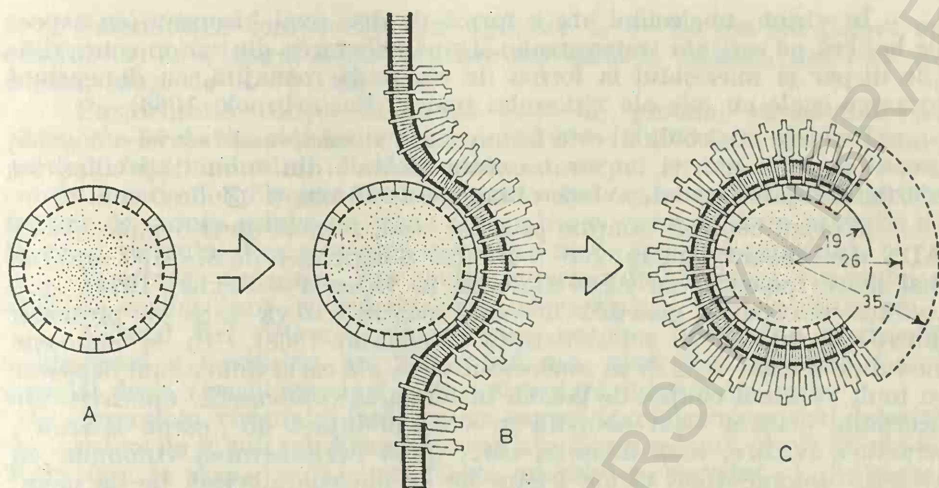


Fig. 32. — Modelul de structură și maturarea togavirusurilor. Nucleocapsida unui *Alphavirus*, asamblată în citoplasmă (A), migrează spre suprafaţa celulei unde interacţionează cu glicoproteinele virale și înmugurește prin membrana celulară modificată (B) pentru a produce virionul matur (C). Sînt marcate razele diferitelor structuri concentrice (în nm), determinate prin difracţie în raze X (după Strauss, 1968).

Toate speciile de *Alphavirus*, ca și cele mai multe specii de *Flavivirus* se multiplică atît în artropode, cît și în gazde vertebrate.

3) Virusurile cu organizare complexă
Grupul Poxvirus *)
(Pl. 7)

Acest grup cuprinde virusurile animale cele mai mari și mai complexe, patogene pentru om și animale domestice sau sălbatice, la care produc infecţii generalizate cu erupţii veziculare sau pustulare (variola, vaccina), cutanate sau tumori benigne, unice sau multiple ale pielii la om (*Molluscum contagiosum*), fibromul sau mixomul Shope la iepure.

Pe baza particularităţilor lor generale și ale gazdelor naturale sînt grupate în mai multe subgrupuri : *Orthopoxvirus* (variola, vaccina, alastrim, ectromelie), *Avipoxvirus* (gazde naturale găina, porumbelul, canarii), *Capripoxvirus* (oaie, capră), *Leporipoxvirus* (produce fibrom și mixom la iepure), *Entomopoxvirus* (limitat la artropode, absent la vertebrate).

Cel mai mult studiat este virusul vaccinei, care are o formă de cărămidă cu colţurile rotunjite și dimensiuni de 220 × 220 × 280 nm. Virionul este format din proteine (~ 89 %), ADN (5—6 %) și lipide (fosfolipide, colesterol, grăsimi neutre, care intră în constituţia membranelor). Microelectronografiile pe secţiuni fine au arătat că virionii vaccinali sînt formaţi dintr-un *nucleoid*, bine definit, care conţine ADN viral, avînd în fiecare parte cîte o masă ovoidală numită „corp lateral". Nucleoidul și corpii laterali sînt acoperiţi de o altă membrană de suprafaţă, bine definită, avînd o structură caracteristică striată.

*) *Poxvirus* = derivat de la pluralul cuvîntului pock, engl. veche = pustulă, ulceraţie.

În virion, nucleoidul are o formă de disc oval biconcav (cu aspect de halteră pe secţiuni transversale). După eliberarea din virion concavităţile dispar şi nucleoidul ia forma de cărămidă rotunjită, cu dimensiuni aproape egale cu cele ale virionului matur (Easterbrook, 1966).

Peretele nucleoidului este format dintr-o *membrană internă* omogenă, groasă de ~5 nm, şi un strat extern alcătuit din subunităţi cilindrice scurte, aranjate regulat, avînd o lungime de 10 nm şi ∅ de 5 nm.

„Corpul central" conţine *genomul viral*, format dintr-o moleculă de ADN d.c. lineară, cu g.m. 160 $\times 10^6$ dal şi lungimea de 87—100 µm (cea mai mare moleculă de ADN descrisă la virusuri — Joklik, 1974), care codifică informaţia genetică necesară pentru cîteva sute de proteine, dintre care 20—30 au rol structural (Woodson, 1968). Nu se cunoaşte modul de aşezare a ADN în nucleoidul viral, ale cărui dimensiuni depăşesc cu mult volumul ocupat de genom în forma sa condensată. Concavităţile „corpului central" sînt ocupate în virionul intact de „corpii laterali", structuri ovalare, bine definite, care, după dezintegrarea virionului cu ajutorul detergenţilor, rămîn legate fie de nucleoidul viral, fie de membrana externă. Compoziţia chimică şi funcţia lor sînt încă necunoscute (fig. 33).

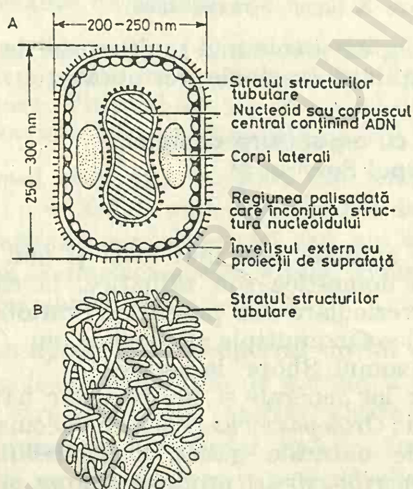


Fig. 33. — *Poxvirus* — reprezentare schematică bazată pe micrografii electronice ale preparatelor colorate negativ şi pe secţiuni ultrafine. A. Secţiune frontală prin virion, evidenţiind structura internă. B. Diagrama prezintă distribuţia structurilor tubulare care formează un strat complex ce acoperă nucleoidul şi corpii laterali (după Horne, 1978).

Membrana externă, de natură lipoproteică, conţine toate fosfolipidele virionului, colesterol şi grăsimi neutre. Lipoproteinele virale par să nu fie derivate din membranele celulare, ci sintetizate *de novo* în citoplasma celulei-gazdă. Structura membranei externe, după coloraţia negativă, apare ca formată dintr-un număr de „tubuli" aranjaţi la întîmplare, care, examinaţi la microscopul electronic cu ajutorul tehnicii de „îngheţare-fracturare" au aspectul unor duble striaţii compuse din subunităţi sferice cu ∅ 5 nm. Dubla striaţie („tubulul") are o lăţime globală de 15 nm, cu o distanţă între striaţii de aproximativ 10 nm, măsurată de la centru la centru.

Subunitățile componente sînt spațiate la 6—7,5 nm (în raport cu centrul lor) de-a lungul striațiilor, care pot varia ca mărime, dar sînt, de regulă, lungi de ~70—100 nm.

Poxvirusurile conțin un număr mare de proteine structurale (cel puțin 20—30 de tipuri diferite; cu g.m. 30 000—100 00 dal), unele situate pe suprafața virionului, altele asociate cu corpul central. De asemenea, conțin o serie de glicoproteine cu glucozamină, care nu diferă chimic, în funcție de natura celulei în care a fost cultivat virionul. Este probabil că în cazul virusului *Pox* aceste glicoproteine să fie specifice virusului.

În sfîrșit, virusurile *Pox* conțin integrate în structura virionului o serie de enzime (exo- și endonucleaze, transcriptaze, proteinkinaze etc.).

Virusul Orf *(Parapoxvirus)*, care produce dermatita pustulară contagioasă a bovinelor, are 260 × 160 nm, fiind deci mai mic și mai ovoidal decît virusul vaccinal. Are o structură internă similară.

Suprafața virionului însă, are un aspect foarte caracteristic datorită unui sistem de tubuli sau filamente aranjate foarte regulat, după un model încrucișat, în zigzag, care apare foarte probabil ca rezultat al „împachetării" („legării") particulei virale de către un filament continuu unic, răsucit în jurul fiecărui virion în 12—15 ture spre stînga (în sens contrar acelor de ceasornic), ca o rețea spiralată laxă.

4) Virusurile cu simetrie complexă

Simetria complexă sau binară este prezentă în modul cel mai evident la bacteriofagii cu coadă contractilă (exemplu fagii *E. coli* din seria T-par) a căror structură formează un adevărat dispozitiv pentru injectarea ADN în celula bacteriană: capul are o simetrie icozaedrică, în timp ce coada o structură helicoidală.

Cultivarea virusurilor

Unul dintre caracterele definitorii ale virusurilor este parazitismul absolut, obligat intracelular, din care decurge incapacitatea lor de a se menţine şi multiplica în afara celulelor vii, din cauza lipsei echipamentului enzimatic, deci a unui metabolism propriu. Ca urmare a acestui fapt, nici un virus nu a putut fi cultivat pe vreun mediu artificial acelular, oricît ar fi de complex. Anumite virusuri umane sînt foarte pretenţioase în ceea ce priveşte natura celulelor pe care le infectează şi unele chiar nu au fost cultivate pînă în prezent în condiţii de laborator. Cele mai multe însă pot fi obţinute în cantităţi suficient de mari, prin cultivare pe diferite tipuri de culturi de celule, prin infectarea unor animale sensibile de laborator sau a embrionului de găină în curs de dezvoltare.

Utilizarea animalelor de laborator infectate experimental

Una dintre primele metode folosite pentru obţinerea unor cantităţi mari de virus constă în infectarea unui animal de laborator receptiv, urmată de recoltarea organelor în care s-a multiplicat virusul, efectuată în perioada în care infecţia este în plină evoluţie sau imediat după moarte. În felul acesta, virusul gripal poate fi obţinut din pulmonii de şoarece, şobolan sau dihor alb, virusul rabic din creierul de iepure sau de oaie, virusul polio din sistemul nervos al maimuţelor sau al unor rozătoare. Cantitatea de virus obţinută, apreciată prin titrul infectant al produselor respective, este în cazul unor virusuri destul de mare: $10^3 - 10^8$ doze-infectante pe mililitru de suspensie de organ.

Limitată ca metodă de diagnostic, datorită folosirii pe scară largă a culturilor de celule, infectarea animalelor de laborator (primate, şoarece, şobolan, hamster etc.) este încă utilizată în cercetarea virologică cu diferite scopuri ca: a) izolarea unor virusuri care nu cresc în culturi de celule; b) cercetări privind oncogeneza virală; c) studiul patogeniei bolilor virale; d) studiul mecanismelor imunităţii antivirale; e) producerea de antiseruri etc.

Cultivarea pe țesuturile embrionului de găină în curs de dezvoltare

Inițiată de Rous (1911) și perfecționată tehnic după 1930 de Goodpasture și Burnet, cultivarea pe oul embrionat este utilă pentru obținerea unor cantități mari dintr-o serie de virusuri animale, cu condiția ca produsele inoculate să nu fie suprainfectate cu bacterii sau alte microorganisme. Se utilizează ouă de găină, cu embrioni în vîrstă de 6—15 zile(după natura virusului), la care inoculările se fac cu precauții de sterilitate pe membrana corioalantoidă sau în cavitatea alantoidiană, intraamniotic, intravenos, intracerebral sau în sacul vitelin.

După 4—5 zile de incubare la 34—37°C, în mod obișnuit embrionul moare din cauza leziunilor produse prin multiplicarea virusului, care poate fi recoltat din lichidul sau membranele în care este localizat (tabelul nr. 3).

Tabelul nr. 3

Cultivarea virusurilor în ouă embrionate (după Fenner, 1974, modificat)

Membrana	Virusul	Semnele multiplicării virale
Sac vitelin	*Herpes simplex*	moartea embrionului
Corion	*Herpes simplex* *Poxvirus* V. sarcom Rous	leziuni pe suprafață
Alantoidă	*Influenza*	hemaglutinare
	Oreion V. Newcastle Adenovirus aviar	moartea embrionului
Amnios	Influenza	hemaglutinare
	Oreion	moartea embrionului

Cultivarea pe oul embrionat este limitată în prezent la tehnica de izolare a virusurilor, fiind folosită în plus pentru unele cercetări și mai ales pentru obținerea unor mari cantități de virus și producerea de vaccinuri (de ex., virusul gripal).

Culturile de celule

Diferite celule sau țesuturi, scoase dintr-un organism prin biopsie sau imediat după moartea acestuia, pot fi menținute în stare de supraviețuire sau chiar pot prolifera *in vitro* (Carrel, 1913) dacă au o suprafață solidă de care să se fixeze („anchorage dependent"), dacă sînt hrănite în mod adecvat și sînt menținute la o temperatură și pH favorabile. Adaptarea celulelor normale la cultivarea în suspensie este însoțită obișnuit de apariția unor modificări ale caracteristicilor celulare.

Se folosesc obișnuit celule sau țesuturi normale umane, adulte sau embrionare (țesut amigdalian, pulmonar sau uterin, embrioni în vîrstă de 4 luni), sau animale (piele, rinichi, mușchi de iepure, maimuță, cobai, șoarece

etc.). De asemenea, se utilizează frecvent diferite țesuturi tumorale. Cultivarea se făcea inițial pe mici fragmente de țesuturi care conțineau fie celule vii, dar neproliferante, menținute în stare de supraviețuire, fie celule în curs de proliferare.

Tehnica culturilor de celule a luat o mare extindere odată cu folosirea, pe lîngă procedeele de asepsie, a antibioticelor pentru limitarea contaminării bacteriene sau fungice și mai ales după ce s-au obținut primele culturi de virus *(Poliovirus)*, (Enders, 1949) și s-au evidențiat efectele citopatogene consecutive.

Metode de cultivare a celulelor

Celulele pot fi cultivate *in vitro* pe trei căi principale:

1) **Culturile de organe** sînt în realitate culturi de țesuturi, obținute sub forma unor fragmente mici extrem de subțiri de organe (intestin subțire proximal, trahee, bronhii) recoltate și întreținute cu grijă, pentru ca să-și mențină arhitectura și funcțiile originare mai multe zile sau săptămîni *in vitro*. Sînt utilizate pentru studiul unor virusuri respiratorii *(Coronavirus)* sau enterice *(Rotavirus)*.

2) **Culturile de țesuturi** au fost folosite originar pentru culturile *in vitro* de mici fragmente de țesuturi în suspensie sau de explante de țesuturi inclavate în plasmă coagulată (Zinsser și Castaneda, 1956). Termenul de „culturi de țesuturi" a fost utilizat ulterior în mod abuziv *senso latu* ca sinonim cu termenul de „cultură de celule" în general, chiar nediferențiate.

3) **Culturile de celule** propriu-zise sînt culturi inițiate după disocierea unui țesut în mici grămezi de celule, prin fragmentare mecanică, urmat de tratare cu enzime proteolitice.

Cultivarea virusurilor în culturi de celule în strat monocelular. Rous (1916) a imaginat o tehnică — perfecționată apoi de Dulbecco (1952) — prin care se obține desfacerea legăturilor intercelulare prin „digestia" substanței cimentante și eliberarea celulelor în suspensie. Pentru a obține celule separate, fragmentul de țesut este inițial dispersat în celulele constitutive, de regulă cu ajutorul tripsinei.

Pentru a evita degradarea proteinelor din membrana celulară și a polipeptidelor intracelulare și ca urmare moartea celulei, tripsina este pusă să acționeze în condiții suboptimale de pH, temperatură și în concentrații foarte mici, asigurînd astfel degradarea preferențială a proteinelor intercelulare. După îndepărtarea tripsinei, celulele sînt însămînțate într-un recipient de sticlă sau plastic (cutie Petri, flacon, eprubetă) cu mediul de cultură lichid, care conține ionii necesari pentru o concentrație izoosmotică, aminoacizi, vitamine și ser animal în proporții variabile. După o perioadă de latență, celulele normale, care au o mare capacitate de adeziune pe suprafețe solide, sedimentează, aderă de peretele vaselor și încep să se dividă acoperind suprafața acestora cu un *strat monocelular* continuu în care efectul citopatogen produs de virus poate fi evidențiat direct prin examinarea prin transparență a eprubetei sau a plăcii de cultură.

Pentru a mări suprafaţa de cultivare s-a recurs la rotaţia lentă a eprubetelor („Roller-tubes cultures") sau a flacoanelor („Roller-bottles cultures"), care permite extinderea monostratului pe întreaga suprafaţă internă a recipientelor de cultură. Recent, Levine (1979) a recomandat cultivarea pe microbile sintetice de Sephadex (Cytodex 1 cu ∅ 60—87 nm), care permite obţinerea a ~100 fibroblaşti pe microsferă. Un flacon conţine ~140 milioane de microsfere, ceea ce determină un potenţial de 10^{12}—10^{16} celule/flacon (fig. 34).

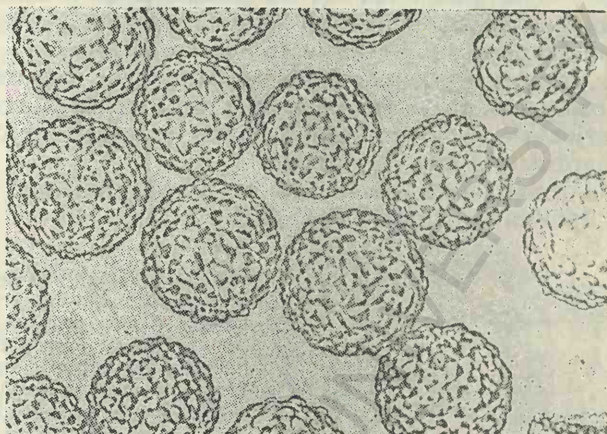


Fig. 34. — Celule de osteosarcom uman cultivate pe perle de Cytodex-Pharmacia Uppsala.

Mediile de cultură folosite curent (Eagle, Hanks etc.) sînt soluţii apoase de substanţe nutritive (glucoză, circa 13 aminoacizi esenţiali, 9 vitamine, săruri minerale, un sistem tampon la pH 7,4, penicilină 0,50 mg %), la care se adaugă 5 % ser sanguin de viţel, pentru aportul unor factori încă necunoscuţi, dar absolut necesari pentru creştere, precum şi un indicator de pH (roşu fenol).

După infectarea culturii, virusul se multiplică în celule, apoi trece la exterior în urma lezării membranei celulare sau a distrugerii celulei, astfel încît poate apoi fi găsit în cantităţi mari în mediul nutritiv folosit pentru a păstra viabilitatea culturii de celule.

Tipurile de culturi de celule

Diferitele tipuri de celule au o comportare diferită în culturi, mergînd de la posibilitatea de menţinere limitată (pentru cîteva generaţii (pasaje) succesive) pînă la menţinerea şi propagarea lor practic indefinită.

Acest comportament diferit poate fi caracterizat sintetic, după cum urmează:

Culturile primare (faza I) sînt culturi iniţiate de la celule, ţesuturi sau organe, preluate direct dintr-un organism şi cultivate *in vitro* sub

formă de strat monocelular pînă în momentul confluenței lor, cînd diviziunile celulare încetează datorită *inhibiției de contact* (de regulă după 5—10 diviziuni). Exemplu: culturile celulare de rinichi de maimuță, de embrioni de pui sau de șoarece folosite pentru replicarea virusurilor, producția de vaccinuri și cercetări de biologie virală. În culturi primare, celulele păstrează încă unele caracteristici ale țesutului din care provin și sînt fie de tip fibroblast („fibroblast-like"), celule plate și alungite, orientate paralel unele față de altele și regulat, fie de tip epitelial („epithelium-like"), cînd apar poligonale și au tendința de a forma placarde. În plus, anumite celule au un contur rotund, semănînd cu celulele epiteliale, dar nu se grupează în placarde *(celule epitelioide)*.

Culturile primare de celule tumorale diferă de cele normale prin faptul că se comportă de la început ca o linie celulară transformată: celulele sînt orientate la întîmplare, formînd grămezi multistratificate, deoarece au pierdut inhibiția de contact.

O cultură primară este considerată ca atare, pînă cînd este trecută pentru prima dată în subculturi (fig. 35).

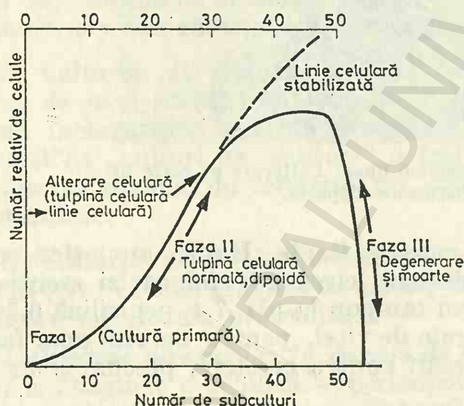


Fig. 35. — Dezvoltarea tulpinilor celulare și a liniilor celulare *in vitro*. Cultura primară (faza I) corespunde celulelor obținute direct din țesutul originar și cultivate în strat monocelular pînă la confluență. Subculturile multiple în monostrat dau naștere fazei a II-a, de tulpini celulare normale diploide, întreținute. Subculturile continue ale tulpinilor celulare (peste 50 ± 10 subculturi) trec în faza a III-a, cînd creșterea și dezvoltarea tulpinii încetează. Alterarea celulelor poate avea loc în orice moment al fazei a II-a, dînd naștere unei linii celulare stabilizate, care poate fi menținută în subculturi indefinit (după Hayflick și Moorhead, 1965).

Culturile secundare. Celulele din culturi primare pot fi folosite pentru inițierea de culturi secundare, după ce sînt desprinse mecanic de pe pereții recipientelor de cultură, fie prin tripsinizare ușoară, fie prin tratare cu un agent chelator de tipul EDTA*).

Spre deosebire de celulele tumorale, care pot iniția culturi secundare chiar în suspensii foarte diluate, celulele normale trebuie folosite în concentrații foarte mari. O cultură confluentă de celule normale, așa-numitele „tulpini celulare", nu poate iniția mai mult de două subculturi, ca și cum pentru supraviețuirea și multiplicarea celulelor recent izolate, mediile de cultură trebuie să conțină în concentrații corespunzătoare factori stimulatori produși de celulele respective.

*) EDTA (acidul etilendiaminotetraacetic) este un agent complexant al Ca^{2+} și Mg^{2+} care sînt absolut necesari pentru fixarea celulelor pe suprafața recipientelor de cultură. Eliminarea ionilor bivalenți din soluție determină desprinderea celulelor, permițînd obținerea de celule dispersate din culturi primare sau din linii celulare continue.

Transferul culturilor primare (faza I) în subculturi multiple dă naștere fazei a doua, în care celulele cultivate în strat monocelular sînt denumite *celule diploide normale menținute* (Dulbecco, 1969). Aceste celule, ca și cele din culturile primare sînt caracterizate prin asemănarea lor morfologică și cromosomală cu țesutul din care provin, printr-o durată de viață limitată în timp și prin necesitatea absolută de a avea o suprafață solidă de care să adere atunci cînd sînt cultivate *in vitro*.

Celulele derivate din țesuturi normale nu pot fi transferate indefinit în serie în subculturi. Ele pot avea două comportări diferite.

În unele cazuri, după ~ 50 ± 10 pasaje, care în mod normal durează circa un an, rata de creștere a celulelor normale devine mai lentă, perioada de timp G_0*) care urmează fiecărei mitoze se lungește treptat, numărul celulelor care intră în faza S (fig. 36) scade, apar modificări morfologice

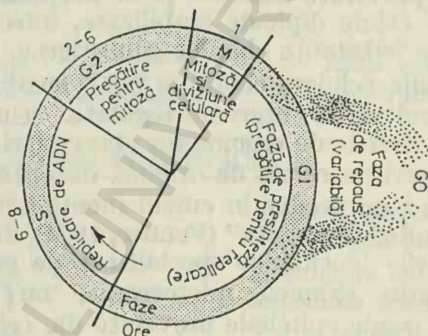


Fig. 36. — Ciclul de creștere a unei celule eucariote incluzînd o fază de repaus (G_0). Variațiile de durată ale ciclului celular sînt datorite în mare măsură variației fazei G_1 (după Kornberg, 1980).

și cromosomale (trecere de la caracterul normal euploid — diploid al celulelor normale la celule cu aberații cromosomale, cromosomi fragmentați etc.) și, în cele din urmă, celulele mor. Cauza morții nu este cunoscută. Ea ar putea fi datorită unui potențial ereditar de durată a vieții limitat, exprimat printr-un număr de generații celulare variabil, caracteristic pentru fiecare tip de celule și organisme. Spre exemplu, celulele epiteliale spre deosebire de fibroblaste degenerează și mor uneori numai după 2—3 subculturi. O altă cauză a morții ar putea fi reprezentată de condițiile imperfecte furnizate de cultivarea *in vitro* care ar favoriza acumularea de microleziuni, care în cele din urmă devin letale.

Liniile celulare stabilizate sau continue constituie a doua modalitate de evoluție a culturilor celulare transplantate în subculturi. În cursul

---

*) Multiplicarea fiecărei celule individuale urmează o evoluție ciclică, în care intervalul de timp dintre două mitoze succesive este împărțit în trei perioade, G_1 (de la engl. gap) (care precede replicarea ADN), S-sinteza (în care ADN se replică) și G_2 (în care celula se pregătește pentru o nouă mitoză). Celulele care nu cresc se opresc obișnuit în faza G_1. Starea de repaus este numită G_0. Durata diferitelor faze este variabilă, cu excepția metafazei care ocupă rar mai mult de o oră. În condiții normale de cultivare, celulele parcurg ciclul de multiplicare nesincronizat, în așa fel încît într-o cultură se găsesc simultan celule în toate fazele de creștere.

multiplicării în subculturi a unei tulpini celulare*) diploide normale, anumite celule suferă alterări reprezentate de modificări morfologice (rotunjire, aspect epitelioid), creştere mai rapidă şi adesea o transformare malignă spontană, deşi este greu de exclus ideea prezenţei iniţiale în populaţia celulară a unor celule maligne sau premaligne. Inoculate la animale, aceste celule produc tumori canceroase. Transformările astfel apărute sînt corelate cu capacitatea celulelor modificate de a suferi un număr indefinit de diviziuni şi de a avea o viaţă practic nelimitată în subculturi, legate de transformarea lor în *linii celulare continue* („continuous cell lines"). Cauza transformării spontane, care poate apărea brusc sau lent, după 60—70 de subculturi sau mult mai devreme în cursul cultivării, este necunoscută.

Liniile celulare stabilizate pot fi obţinute şi direct prin cultivarea celulelor provenite dintr-un ţesut neoplazic sau din culturi primare normale sau celule diploide stabilizate, infectate cu virusuri oncogene sau tratate cu substanţe chimice cancerigene.

Liniile celulare continue pot fi menţinute practic indefinit *in vitro*, prin subculturi la intervale regulate. Celulele lor au o morfologie anormală, un număr de cromosomi anormali şi adeseori nu mai păstrează asemănări mari cu celula de origine, datorită numeroaselor mutaţii secvenţiale care s-au produs în cursul menţinerii lor îndelungate în subculturi. Ele sînt „dediferenţiate" (Fenner, 1974), dacă şi-au pierdut morfologia şi proprietăţile biochimice specializate pe care le aveau la origine, şi, de aceea, prin examen microscopic, nu se poate face diferenţa între liniile de celule epiteliale provenite din celule de origine ectodermică sau endodermică sau între liniile celulare „fibroblastice" apărute în celule cu origine mezodermală. În afară de caracterul lor aneuploid şi de capacitatea de propagare indefinită, liniile stabilizate produc tumori dacă sînt transplantate la animale şi se pot dezvolta ca şi bacteriile în suspensie. Exemple : celulele HeLa**), BHK (engl. *baby hamster kidney* = rinichi de pui de hamster), KB (derivat din carcinom mamar) etc.

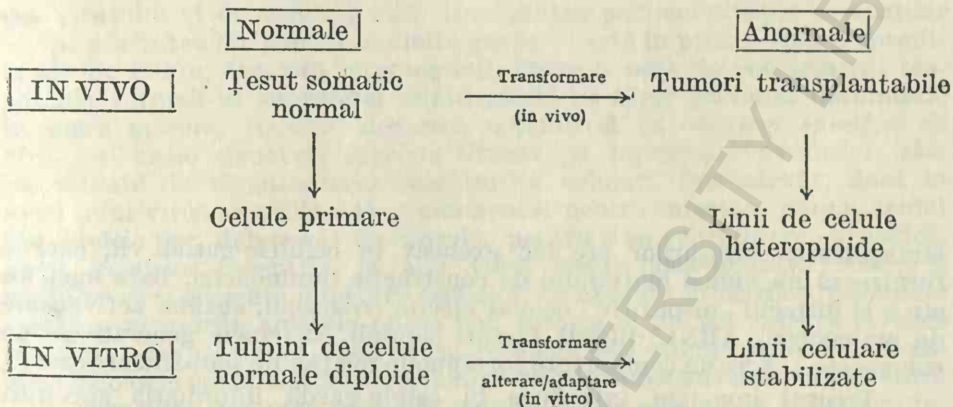
În cursul transferării repetate — în serie — compoziţia liniilor celulare continue suferă în continuare modificări, uneori extensive, determinate de apariţia şi selecţia unor noi variante. În acest proces pot apărea şi celule foarte alterate, cu slabă capacitate de aderare la peretele vaselor de cultură, care pot fi propagate în suspensie în medii sărace în ioni bivalenţi şi cu agitare continuă *(culturi în suspensie)* (sistem Maitland).

---

*) *Tulpina de celule* reprezintă o populaţie de celule derivate fie dintr-o cultură primară, fie prin selecţia sau clonarea celulelor care au proprietăţi sau markeri specifici. Proprietăţile sau markerii trebuie să persiste în cursul cultivărilor ulterioare.

**) Linie celulară, de provenienţă şi natură discutabilă, cu mare capacitate de proliferare. Izolată dintr-un cancer epidermoid de col uterin de la bolnava *Helen Lane* (Gey şi colab., 1951) sau dintr-un adenocarcinom al glandelor colului uterin de la bolnava *Henriett Lacks* (Mckusik, 1971).

Relaţiile şi caracteristicile celulelor normale şi anormale de mamifere în culturi *in vivo* şi *in vitro* (după Hayflick şi Moorehead, 1965) sînt următoarele:



CARACTERISTICI

Diploide	Număr anormal de cromosomi
Histologic celule normale	Histologic celule anormale (canceroase)
Creştere limitată în timp (max. 50 ± 10 diviziuni)	Pot fi menţinute indefinit în subculturi
Dependente de fixare pe suporturi solide	Nedependente de fixare pe suporturi solide
Necesită cultivare în strat monocelular	Pot fi cultivate în suspensie, libere în mediu

Introducerea culturilor de celule în practica virologică a deschis calea a numeroase aplicaţii legate de izolarea şi identificarea virusurilor, studiul efectului lor citopatogen, al mecanismelor şi dinamicii replicării virale, geneticii virusurilor, oncogenezei virale şi terapeuticii antivirale, producţiei de vaccinuri antivirale, precum şi al unor probleme de ordin general ca dezvoltarea şi diferenţierea celulară, fenomenele de îmbătrînire, refacerea ţesuturilor şi producţia de interferon, de substanţe complexe extrase în mod obişnuit din ţesuturile proaspete.

Liniile celulare stabilizate nu sînt folosite în producţia de vaccinuri virale sau de produşi celulari pentru uz farmaceutic uman, deşi cresc repede şi bogat, datorită asemănării lor cu celulele tumorale. Sînt preferate celulele din culturi primare, controlate riguros, pentru a evita prezenţa virusurilor latente naturale, care ar putea reprezenta un pericol potenţial pentru sănătatea celor vaccinaţi.

Replicarea virusurilor

(Pl. 8—13)

Multiplicarea virusurilor are loc exclusiv în celulele-gazdă vii, care le furnizează nu numai materialul de construcţie (aminoacizi, baze nucleice etc.), ci întregul „dispozitiv" celular efector (ribosomi, enzime activatoare de aminoacizi, ARNt, diferiţi factori solubili, sistemele generatoare de energie etc.). Această comportare corespunde relaţiei de parazitism absolut.

Virusul invadant introduce în celula-gazdă informaţia specifică propriului său genom şi deviază metabolismul acesteia în aşa fel încît virusul preia „maşinăria" de biosinteză a celulei şi o foloseşte pentru propriile sale sinteze, precum şi pentru sinteza unor proteine care reglează activităţile metabolice ale celulei infectate. Virusurile inhibă specific sau stopează complet sinteza de constituenţi celulari (ARN, ADN, proteine) prin intermediul unor proteine virale în aşa fel încît celula infectată produce aproape în exclusivitate constituenţi virali.

Deşi celula-gazdă poate furniza cele mai multe funcţii necesare replicării virale, nu le poate asigura pe toate. De aceea, replicarea este condiţionată, în foarte multe cazuri, de sinteza timpurie a unor enzime noi, specific virale, utilizînd informaţia genetică proprie genomului viral.

Replicarea virusurilor (producerea de noi copii de genom viral, urmată de încapsidarea lor într-un înveliş proteic pentru a forma virusul progen) este condiţionată de infecţia simultană a unei populaţii de celule cu cel puţin cîte o particulă virală. Practic însă pentru a asigura infectarea fiecărei celule şi un grad înalt de sincronizare a evenimentelor care urmează în populaţia de celule infectate sînt necesare cîte 10—100 particule infectante/celulă (Burke şi Russell, 1975).

Procesul decurge într-o serie de etape succesive, ± secvenţiale, deşi o anumită fază trece treptat în cea următoare în aşa fel încît, după cîteva ore de la infecţie, mai multe din fazele următoare raportate la un virus cu genom ADN se pot petrece simultan: a) adsorbţia şi fixarea virusului; b) pătrunderea în celule care coincide sau duce la c) faza de decapsidare şi eclipsă (dispariţia virionului infecţios); d) transcrierea ARNm de la genomul parental; e) „traducerea" informaţiei pentru enzimele virale şi a altor proteine „timpurii"; f) replicarea genomului viral; g) transcrierea la ARNm în continuare a ADN progen şi parental; h) traducerea ARNm „tardiv" în proteine structurale şi proteine virale de reglare; i) sfîrşitul fazei de eclipsă cu morfogeneza (asamblarea) virusului; j) eliberarea lui din celulă şi iniţierea unui nou ciclu de replicare.

Adsorbția virusurilor pe celula-gazdă

Pentru a pătrunde eficient în celulă, virusul trebuie să dispună de un mecanism care să asigure fixarea pe celula-gazdă pînă în momentul cînd este înglobat în aceasta. Acest mecanism variază în funcție de morfologia virusului și de celula-gazdă. Una dintre particularitățile virusurilor — specificitatea lor pentru anumite gazde — este în primul rînd o specificitate de fixare, datorită interacțiunii dintre o serie de constituenți biochimici normali ai suprafeței celulei-gazdă (a căror prezență determină, în mare măsură, fixarea, deoarece acționează ca *receptori specifici de virus)* și unele structuri speciale situate pe suprafața virusurilor, răspunzătoare de recunoașterea receptorilor celulari. Într-adevăr, dacă în locul unui virus se utilizează experimental pentru infectare numai acidul său nucleic pur, debarasat de capsidă, pentru a se evita fixarea specifică, gama celulelor receptive la acel virus crește (specificitatea scade) și odată cu ea și eficiența infectării celulelor. În absența situsurilor receptoare specifice virusurile animale nu se pot adsorbi și nu pot infecta celulele respective. De asemenea, dacă situsul receptor este alterat printr-un mecanism fiziologic sau prin mutație, celula-gazdă poate deveni rezistentă la virus.

Structura cea mai adecvată pentru fixare este aceea a bacteriofagului, iar receptorii cei mai bine cunoscuți sînt cei de pe suprafața celulei bacteriene, care asigură un înalt grad de specificitate interacțiunii fag-bacterie.

Celulele vegetale nu au receptori de virus, de aceea virusurile plantelor nu au specificitate de fixare. Ele nu pot adera la peretele celulozic al celulelor vegetale și nu-l pot străbate decît dacă integritatea acestuia a fost afectată prin leziuni mecanice. De aceea, infectarea plantelor necesită cantități mari de virus. În schimb, odată produsă ea este însoțită de o multiplicare virală foarte intensă în celulele infectate.

Virusurile animale se fixează mai puțin specific și mai puțin eficient decît fagii. După o serie de ciocniri întîmplătoare ale virusului cu celula respectivă, rezultate din mișcarea browniană, și după o fază de adsorbție nespecifică reversibilă, determinată de atracția ionică, urmează faza de *adsorbție specifică ireversibilă.* Stabilitatea adsorbției specifice depinde de forțe electrostatice (influențate de pH și concentrația cationilor) și, în cele mai multe cazuri, de complementaritatea între moleculele specifice de pe suprafața virusului și de pe aceea a celulei cu care a venit în contact. În condiții favorabile de complementaritate geometrică și electrostatică, virusul și celula se leagă prin legături ionice van der Waals sau prin legături de H, suficient de puternice pentru a contracara forțele de dispersie. După Allison și Valentine (1974), grupările amino- ale capsidei virale ar interacționa cu grupările fosfat puternic acide ale suprafeței celulei-gazdă. Rata fixării (eficiența coliziunilor) observată frecvent este de $3-5 \times 10^9$ datorită faptului că o particulă virală trebuie, probabil, să se lovească de mai multe ori de o celulă înainte de a se fixa specific pe ea.

Pentru fixarea virusurilor nu este necesară integritatea celulei. Chiar membranele plasmatice izolate prezintă receptori și interacționează specific cu virusurile. Rolul receptorilor specifici de virusuri este evident la *Poliovirus*, care se adsoarbe numai pe celule de om și de maimuță, iar în organism numai pe celule intestinale și ale sistemului nervos central.

Celelalte tipuri de celule umane sau de maimuţă sînt infectate numai după cultivarea *in vitro* care produce „demascarea" receptorilor celulari. Adsorbţia poate fi suprimată prin îndepărtarea sau inactivarea unor receptori virali.

Bazele moleculare ale adsorbţiei virusurilor. Receptorii de virus sînt constituenţi normali ai suprafeţelor celulare, care prezintă o configuraţie structurală pentru care virusurile au o mare afinitate, datorită căreia în condiţii fiziologice se leagă în mod specific. Specificitatea lor este conferită, după caz, de o parte a unei micromolecule sau de porţiuni din mai multe molecule. Natura receptorilor celulari şi a constituenţilor virali care interacţionează cu ei variază pentru fiecare tip de virus.

La *Myxovirus*, situsul iniţial de interacţiune pe suprafaţa celulară este reprezentat de o substanţă mucoidă glicoproteică care conţine resturi de acid neuraminic (acid sialic). Contactul virus—celulă este stabilit prin intermediul spiculelor (hemaglutinine) prezente pe suprafaţa virionilor. După aceea, stratul mucos este dizolvat local sub acţiunea unei enzime virale, neuraminidaza, pentru a permite o fixare mai fermă şi mai intimă, facilitînd şi pătrunderea în celulă. Îndepărtarea receptorilor pe cale enzimatică (prin tratare cu neuraminidază) împiedică adsorbţia virusului pe celule o perioadă de timp necesară pentru regenerarea receptorilor.

În cazul adenovirusurilor receptorul celular de virus este reprezentat de un polipeptid cu g.m. 78 000 dal, probabil constituent principal al tonofibrilelor, şi de o proteină auxiliară (g.m. 42 000 dal) cu rol încă nedefinit. Suprafeţele corespunzătoare de legare de pe virioni sînt reprezentate de fibrele pentonilor, situate la cele 12 vîrfuri ale capsidei, care reprezintă tot atîtea puncte de contact cu cei 10^4—10^5 receptori de virus de pe suprafaţa unei celule umane. După o legare preliminară, se formează un complex multivalent virus — receptori, rezultat din concentrarea unor situsuri receptoare din vecinătate, favorizînd invaginarea membranei plasmatice şi înglobarea particulei (Howe, 1980). Mişcarea de translaţie a proteinelor receptoare prin matricea lipidică a membranei depinde de fluiditatea acesteia, deoarece este dependentă de temperatură.

Virusurile din grupul Pox se leagă de membrana celulară prin intermediul structurilor tubulare de pe suprafaţa lor, care fie că au ele înşile un principiu activ de fuzionare, fie că participă la reglarea acesteia.

Adsorbţia virusurilor pe celule este facilitată de faptul că numărul receptorilor de virus este în general mare. Celulele KB au pe suprafaţa lor ~10 000 receptori specifici pentru *Adenovirus 2*, iar unele celule animale au ~100 000 de receptori pentru virusul Sendai. În plus, aşezarea simetrică radiară a spiculelor glicoproteice pe suprafaţa învelişurilor virale, ca şi arhitectura icozaedrică a multor virusuri „nude" asigură virionilor multiple puncte de fixare pe situsuri echivalente, în cursul interacţiunii cu receptorii celulari (Dales, 1978).

Pătrunderea virusului în celulă

(Pl. 8, 9)

Faza de înglobare sau de pătrundere a virusurilor în celula-gazdă se desfăşoară după mecanisme diferite, în funcţie de natura virusului şi a celulei, în special a structurilor lor de suprafaţă.

Bacteriile şi celulele vegetale sînt infectate după mecanisme diferite de celulele animale care nu au perete celular. În cazul bacteriofagilor, pătrunderea acizilor nucleici în celula bacteriană necesită traversarea unui perete celular complex şi a membranei plasmatice. Ca urmare, fagii T-par au dezvoltat un aparat complex, care permite injectarea eficientă a genomului fagic.

Prin contrast, virusurile animale au dezvoltat strategii diferite menite să asigure traversarea membranei celulare şi pătrunderea într-o celulă organizată în mai multe compartimente distincte, separate de o reţea de membrane. Secvenţa ordonată a evenimentelor legate de acest proces asigură ajungerea rapidă şi eficientă a genomului viral la locul în care informaţia sa genetică poate fi utilizată (fig. 37).

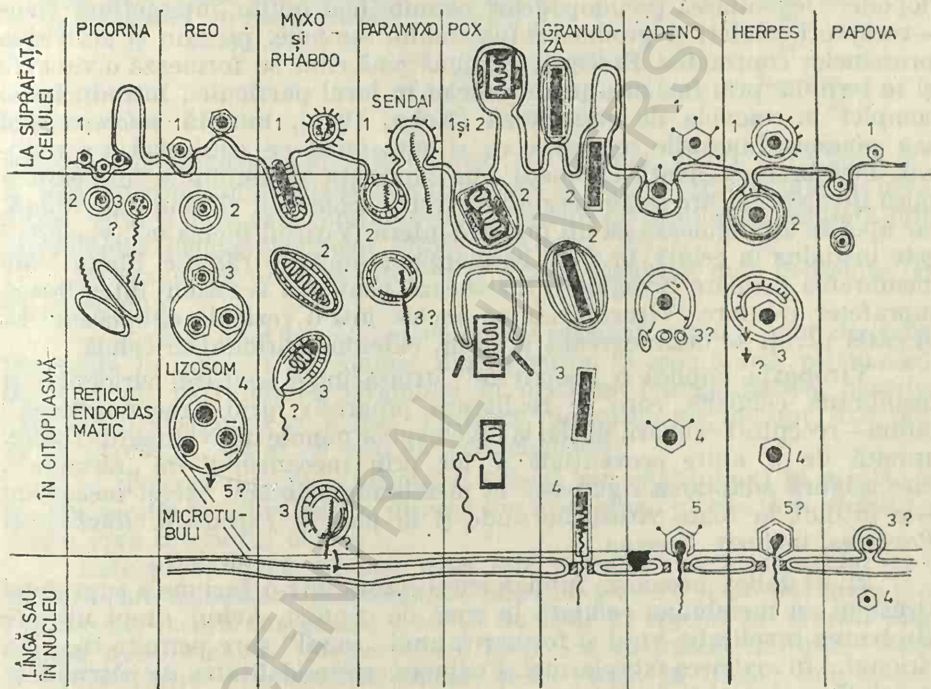


Fig. 37. — Modalităţi de pătrundere a virusurilor animale în celule (după Dales, 1978).

În ciuda diversităţii mecanismelor de înglobare, Dales (1973, 1978), bazîndu-se pe observaţii electronooptice, a arătat că după fixarea ireversibilă a virionului pe celula-gazdă, pătrunderea în celulă se poate realiza prin două mecanisme fundamentale: *endocitoza**) şi *fuziunea*.

*) *Endocitoza* (Allison şi Davies, 1974; Silverstein, 1977) reprezintă procesul de înglobare a substanţelor solubile sau particulate din mediul extracelular pe calea unor vezicule sau vacuole derivate din membrana plasmatică. Înglobarea unor particule mai mari de 1 μm este numită *fagocitoză*. Înglobarea de lichide, numită pinocitoză, poate fi de două tipuri: a) *înglobarea de fază fluidă*, numită şi *macropinocitoză*, implică înglobarea de lichide în vezicule cu Ø ~ 0,3 — 2 μm şi este caracteristică substanţelor care nu au receptori specifici pe suprafaţa celulelor; b) *înglobarea adsorbtivă* sau *micropinocitoza*, în care moleculele adsorbite sau particulele similare virusurilor sînt înglobate în vezicule cu Ø de ~ 70 nm (Kohn, 1979).

1) Mecanismul predominant de înglobare a virusurilor animale în celule este endocitoza *(viropexia)* (Fazekas de St. Groth, 1952) proces activ de ingestie, analog celui de pinocitoză (proces prin care celulele captează și înglobează picături de lichid prin invaginarea membranei celulare), asigurînd pătrunderea virionului intact în interiorul celulei-gazdă. Interacțiunea inițială a suprafeței particulei virale cu receptorii de pe suprafața membranei celulare *per se* nu este suficientă pentru a amorsa ingestia particulei legate.

Înglobarea ar fi consecința unui mecanism similar celui al unui fermoar („zipper-like mechanism", Griffin, 1976): legarea inițială virus — receptor celular ar genera un semnal care declanșează agregarea proteinelor contractile (microfilamente) din celule și formarea unor pseudopode. Dezvoltarea pseudopodelor permite mai multe interacțiuni virus —receptori celulari și produce și mai multe semnale, precum și activarea proteinelor contractile. Procesul continuă pînă cînd se formează o vacuolă și se termină prin fuziunea membranelor în jurul particulei, introducînd-o complet în vacuola de endocitoză (Kohn, 1979), numită *microveziculă* sau *pinosom*. Lucrurile se petrec ca și cum după ce contactul s-a realizat, membrana celulară „alunecă" pe suprafața virionului și formează o mică invaginare care se adîncește progresiv, acoperind virionii individuali, iar apoi se strangulează ca un mugure intern. Virusul închis în „vacuolă" este introdus în celulă, în timp ce marginile opuse — rămase libere— ale membranei celulare invaginate fuzionează pentru a restabili integritatea suprafeței celulare. Virusul rămîne inclus într-o veziculă citoplasmatică ai cărei pereți se dezintegrează ulterior, eliberînd virionul în celulă.

Viropexia implică o „potrivire" strînsă între conturul virionului și membrana celulară, care se realizează progresiv prin „recunoașterea" virion—receptori celulari, inițial la nivelul unor puncte individuale de fixare, urmată de o unire secvențială a lor prin mecanismul de „fermoar", care asigură adaptarea riguroasă la membrana celulară. Acest mecanism este întîlnit la toate virusurile nude și în plus la *Influenza*, *Rhabdo-* și *Poxvirus*, inclusiv *Vaccina*.

2) Al doilea mecanism fundamental constă într-o fuziune a suprafeței virusului cu membrana celulară la zona de contact, avînd drept urmare dizolvarea învelișului viral și formarea unui „canal" care permite trecerea virionului în matricea citoplasmei. Fuziunea este modalitatea de pătrundere în celulă caracteristică virusurilor cu înveliș extern, la care reprezintă un mecanism invers față de cel prin care acesta ia naștere în momentul eliberării din celulă și este dependentă, în mare măsură, de anumite proteine ale învelișului viral, în special glicoproteine.

Fuziunea este întîlnită la unele paramixovirusuri și la virusul *Pox*, ceea ce demonstrează că înglobarea unor virioni prin viropexie nu exclude, la aceleași grupe de virusuri, intervenția mecanismului de fuziune virus —celulă.

Cele două mecanisme pot coexista frecvent în aceeași celulă pentru același virus. Este posibil chiar ca în cazul virusurilor vaccină *(Pox)* sau Sendai *(Paramyxovirus)* fuziunea să fie o etapă premergătoare aceleia în care membrana celulară este mobilizată pentru a îngloba virusul prin fagocitoză. Dealtfel, fuziunea ar reprezenta, după Miyamoto și

Morgan (1971), o fază preliminară obligatorie a viropexiei (fig. 38). Paramixovirusurile conţin chiar o *proteină de fuzionare* specială („proteina F"), absolut necesară pentru iniţierea infecţiei prin fuzionarea virionului cu

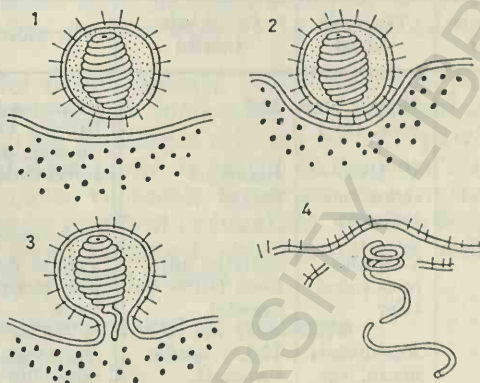


Fig. 38. — Reprezentarea schematică a mecanismului de fixare şi pătrundere prin fuziune a unei particule de *Myxovirus*. După contactul cu suprafaţa celulei-gazdă (1), învelişul viral fuzionează (2) cu membrana plasmatică, formînd o structură continuă (3), după care nucleocapsida este eliberată în citoplasmă (4) (după Horne, 1978).

membranele celulelor sensibile (Scheid şi Choppin, 1974). „Proteina F" îşi exercită rolul numai dacă este inclavată în dublul strat lipidic al învelişului viral şi dacă este ţinută în contact strîns cu membrana celulară prin intermediul hemaglutininelor (Rott şi Klenk, 1977).

În cazuri particulare intervin şi alte mecanisme mai deosebite, ca de exemplu:

— apariţia unor breşe ale membranei plasmatice sau a unor dizolvări localizate la punctul de contact dintre virion şi membrana plasmatică, care permit pătrunderea virionului în matricea citoplasmatică, datorită capacităţii virionului de a liza, printr-un mecanism necunoscut, atît propriile învelişuri, cît şi pe cele ale celulei-gazdă;

— trecerea directă a virionilor intacţi sau cvasiintacţi în celulă, ca şi cum aceştia ar „dizolva" în drumul lor membrana plasmatică, creîndu-şi drum spre interiorul celulei.

Este probabil că, acelaşi virus este endocitat uşor la nivelul unor zone în care membrana celulei-gazdă este mai plastică şi ar pătrunde prin fuziune cu membrana-gazdă, urmată de liză, în special la nivelul unor regiuni nedeformabile (microvili, cili etc.). Interacţiunile mutuale strînse şi subtile între componenţii celulari şi cei virali, în fiecare din etapele procesului de pătrundere a virusurilor în celule, au dus la presupunerea că proprietăţile acestora ca paraziţi au evoluat în strînsă relaţie cu organizarea şi funcţionarea celulelor-gazdă (Dales, 1980), (tabelul nr. 4).

Decapsidarea

Pentru a-şi exercita funcţia, genomul viral trebuie să fie mai întîi debarasat de învelişurile sale. Decapsidarea este procesul de conversie treptată a virionilor din starea lor normală (virus matur, uneori cu peplos) în structuri subvirale, cu eliberarea genomului viral şi trecerea virionului în starea de virus vegetativ. Ea se realizează după mecanisme foarte diferite de la un virus la altul.

Tabelul nr. 4

Principalele mecanisme de pătrundere a virionilor sau particulelor subvirale în celulele animale (după Dales, 1973, modificat)

Mecanismul	Tipul de virus	Celula sau ţesutul	Mecanismul	Tipul de virus	Celula sau ţesutul
Viropexie	Herpes simplex, tip 1	HeLa	Fuziunea învelişurilor virale cu membrana microvililor	V. granulozei insectelor	Microvili, celule columnare (intestin mijlociu de insecte)
	V. Molluscum contagiosum	Epidermă umană			
	V. granulozei insectelor	Intestin mijlociu (larve de insecte)	Trecere directă prin plasmalemă	Adenovirus (alte tipuri) Polio 1	HeLa, celule umane şi maimuţă
	Adenovirus uman, tip 1, 5, 7 Influenza tip A	HeLa, celulă tumorală, ascită Ehrlich	Dezintegrarea virionului şi a membranei plasmatice la punctul de contact	Influenza WSN	Embrion de găină
Viropexie şi fuziune	Herpes simplex (alte tipuri) Influenza PR8	HeLa, membrană chorioalantoidă (pui de găină)	Breşe sau soluţii de continuitate în plasmalemă	V. leucemiei Rauscher	Embrion de şoarece

La unele virusuri (enterovirusuri), genomul este eliberat chiar la nivelul membranei celulare, în timp ce la altele eliberarea se realizează numai după înglobarea virusului intact în celulă.

La virusurile *Pox*, decapsidarea este un proces intracelular complex, care se produce după aproximativ o oră de la infecţia celulei şi se realizează prin ieşirea ADN din structura „corpului central" în matricea citoplasmatică, în urma apariţiei de rupturi în învelişul proteic al virusului.

Adenovirusurile, după ce au pătruns în celulă, pierd unele structuri capsidale (probabil fibrele şi unităţile de bază ale pentonilor), după care genomul ADN iese din capsidă în zona perinucleară la nivelul porilor nucleari.

În sfirşit, alte virusuri (*Reovirus*) nu suferă niciodată o „dezvelire" completă, deoarece transcriptazele asociate cu virionul funcţionează chiar în „corpul central" al virionului care este menţinut $\pm$ intact. Timpul necesar pentru adsorbţie şi decapsidare variază de la citeva minute la $\sim$2 ore.

Soarta capsomerelor după dezmembrarea virionului nu este cunoscută, dar se crede că, devenite nefuncţionale, ele intră în metabolismul general al celulei.

Perioada în care genomul viral este liber în celulă (virus vegetativ) a fost descrisă ca o fază de dispariţie a virusului — faza de eclipsă — termen cu interes istoric, reflectînd „dispariţia virusului infecţios", care nu mai poate fi evidenţiat în celulă înainte de apariţia virionilor progeni rezultaţi din replicare. În realitate este vorba numai de o schimbare de

stare a virusului, care-l face mai greu de evidențiat, deoarece acidul nucleic izolat are mai puține posibilități de a iniția infecția, în comparație cu virusul „complet" matur. Durata perioadei de eclipsă este variabilă de la un virus la altul, oscilînd între 1—2 ore la *Poliovirus*, 3—5 ore la *Herpes* și *Myxovirus*, 4 ore la *Reo-* și *Poxvirus*, 8—10 ore la *Adenovirus* și 12—14 ore la *Papovavirus*.

Primele trei faze ale ciclului de multiplicare virală(adsorbția, pătrunderea și decapsidarea) sînt procese relativ ineficiente, datorită faptului că virionii se pot adsorbi și în zone ale suprafeței celulare în care pătrunderea nu poate avea loc, genomul liber poate fi atacat de nucleaze celulare sau uneori particulele nu pot părăsi vacuolele fagocitare în care au fost înglobate. De aceea, raportul dintre numărul particulelor virale infecțioase raportat la numărul total de virioni introduși, spre exemplu în culturile de celule, este aproape totdeauna cu mult subunitar.

Deplasarea virusurilor la locul de replicare

(Pl. 10, 11)

După pătrunderea lor în celulă, virusurile se deplasează la sediul ultim al funcționării genomului lor, urmînd o mare diversitate de căi. Cele care se multiplică în citoplasmă ajung direct la destinație, imediat după ce trec prin membrana plasmatică. În cazul virusului *Pox*, după îndepărtarea membranei vacuolare și a învelișurilor virale, nucleoidul este degradat, permițînd eliberarea genomului care funcționează *in situ*, în „fabrica" de virus citoplasmatică. În cazul virusurilor care își desfășoară o parte din ciclul lor de replicare în nucleu *(Adeno,- Herpes-, Papova-, Myxovirus)* este necesar transferul lor rapid de la periferia celulei pînă în nucleu. În general, nucleul este situat mai aproape de anumite regiuni ale membranei plasmatice decît de altele, astfel încît diferiții virioni nu au de parcurs o distanță egală. Nu se cunosc căile prin care virusurile circulă pînă la nucleu, dar cea mai simplă presupunere este aceea că transportul lor s-ar realiza pe căi celulare preexistente.

Transferul virusurilor s-ar putea realiza pe o cale directă, prin diferitele membrane citoplasmatice care se interpun în drumul lor, sau, pe o cale indirectă, dar cu mai puține piedici, incluse în interiorul unor cisterne și transportate odată cu acestea. Ambele căi presupun că migrarea virusului în interiorul celulei este vectorială, că virusul „știe unde merge". Ideea unei circulații întîmplătoare este greu de luat în seamă, deoarece după 15′ de la infecție 50 % din virusul gripal este în nucleu (Dimmock, 1975), ceea ce sugerează în plus, că virusurile pot trece prin membrane cu ușurință foarte mare sau că ocolesc membranele, folosind probabil cisternele.

Deoarece porii nucleari (∅ 10—30 nm) nu sînt liber permeabili pentru macromolecule, se presupune că transportul virusurilor în nucleu se poate realiza prin fuziune, pinocitoză sau pătrundere directă și că prezența unor receptori de membrană poate impune un anumit grad de specificitate (Dimmock, 1975). Astfel, în cursul replicării virusului *Influenza*, din cele 8 proteine sintetizate în citoplasmă, două sînt transportate în nucleu, și anume proteina nucleocapsidei (NC) în nucleoplasmă și proteina nestructurală (NS) în nucleol.

În unele cazuri, microscopia electronică a furnizat numeroase detalii privind „circulaţia" virusului în celula infectată:

— Virusurile din grupul *Papova* şi oncornavirusurile aviare sînt transferate pe calea vacuolelor fagocitare pînă la nucleu, după care virusul intact sau componentele subvirale ajung în nucleoplasmă după o fuziune prealabilă între membrana vacuolelor care poartă virusul şi membrana nucleară.

— Adenovirusurile debarasate de învelişurile vacuolei se deplasează prin matricea citplasmatică pînă ajung în contact cu un por nuclear, prin care acidul nucleic este transferat în nucleu, în timp ce capsida rămîne în afara acestuia.

— Picornavirusurile se replică după ce genomul lor se leagă specific de membranele reticulului endoplasmic neted, care reprezintă situsurile activităţii ARN-polimerazei dependente de ARN, în timp ce reovirusurile se fixează probabil pe microtubuli, la nivelul cărora începe transcrierea genomului lor la ARNm.

Biosinteza proteinelor „timpurii"

După decapsidare, genomul viral poate iniţia procesul de biosinteză a constituenţilor virali, care evoluează în trei faze succesive: a) *biosinteza proteinelor „timpurii"*; b) *replicarea genomului viral*; c) *biosinteza proteinelor „tardive"*. Genomul dezoxivirusurilor conţine două tipuri de gene, care se deosebesc funcţional în raport cu momentul intrării lor în acţiune în cursul ciclului de replicare a virusurilor: *genele „precoce"* şi *genele „tardive"*. La unele virusuri cele două tipuri de gene sînt localizate chiar pe catene diferite.

Perioada precoce a biosintezei proteinelor precede replicarea genomului viral şi asigură activarea reacţiilor necesare pentru ca aceasta să aibă loc.

Proteinele precoce sau timpurii („early proteins") aparţin mai multor categorii cu funcţii specifice ca: a) proteine care inhibă sinteza ADN, ARN şi a proteinelor celulei-gazdă, modificînd specificitatea sistemelor de replicare, transcriere şi traducere a informaţiei genetice celulare, în aşa fel încît informaţia genetică virală este prelucrată cu prioritate faţă de cea a gazdei; b) proteine virale care formează matricea incluziunilor nucleare sau citoplasmatice în care are loc replicarea acidului nucleic viral şi morfogeneza virusurilor; c) proteine enzimatice, în special ARN sau ADN-polimeraze, nucleaze, ADN-ligaze şi d) în mod excepţional, chiar unele proteine structurale de capsidă, precum şi alte proteine active în cursul procesului de multiplicare, ca de exemplu proteine capabile să iniţieze replicarea ADN, proteine de legare a ADN („DNA-binding proteins" etc.).

Gradul de expresie a fazei timpurii este variabil. Unele genomuri virale conţin mai puţină informaţie şi exprimă numai cîteva funcţii „timpurii", în timp ce altele *(Poxvirus)* pot exprima 30—50 funcţii de acest gen. În majoritatea cazurilor, transcrierea ADN „precoce" este efectuată de ARN-polimeraze celulare (transcriptaze), cu formarea iniţială de *ARN premesager* (fig. 39), care suferă o serie întreagă de procese de

„maturare" (de ex., îndepărtarea secvențelor fără rol de codificare *(introni)* datorită structurii discontinue a genelor și formarea ARNm matur prin unirea („splicing"*)) secvențelor cu semnificație pentru traducerea lor în proteine). În cazul ribovirusurilor cu genom « + », ARNm este

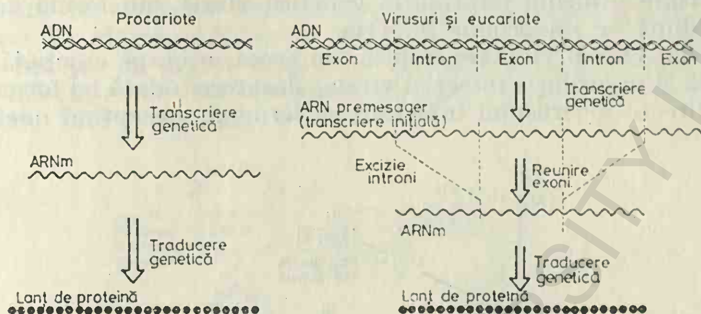


Fig. 39. — Diferențele în exprimarea ADN la procariote față de virusuri și eucariote. La bacterii, informația genetică din gena structurală este transcrisă direct la ARNm și tradusă într-o proteină. La virusuri și eucariote, unele gene structurale (cele mai multe la eucariotele superioare) sînt „întrerupte": secvențele codificatoare *(exoni)* sînt separate prin secvențe intercalate fără rol de codificare *(introni)*. Gena întreagă este transcrisă neîntrerupt pentru a forma ARN-premesager (primar), după care secvențele de transcriere ale intronilor sînt excizate, iar cele ale exonilor, reunite, „înnădite", pentru a forma ARNm matur, care este tradus la proteine.

reprezentat chiar de genomul viral. În toate celelalte cazuri este necesară formarea prealabilă de ARNm «+» prin transcrierea segmentului corespunzător al genomului parental de către polimerazele prezente în virion.

Exprimarea intracelulară a genomului viral. Sistemele genetice virale

Infecția virală a unei celule are drept consecință stabilirea unui nou sistem genetic care deviază metabolismul celulei normale, permițînd replicarea materialului genetic viral și exprimarea informației genetice codificată în el (Baltimore, 1971).

Sistemul genetic viral este reprezentat de ansamblul mecanismelor specifice prin care un virus dat își desfășoară procesele de *replicare* și *transcriere*, ai căror produși finali sînt genomurile virale progene și respectiv moleculele de ARNm viral care servesc la biosinteza proteinelor virale. O alternativă posibilă este *integrarea* genomului viral în genomul celular.

În infecțiile litice noul sistem genetic (viral) elimină sistemul genetic al gazdei, în timp ce în infecțiile avirulente (temperate), ca și în cele urmate de integrare, cele două sisteme genetice pot coexista.

---

*) Problema va fi tratată în volumul II.

Transcrierea informației genetice virale. Sinteza ARNm viral. Replicarea genomului viral. În cursul procesului de replicare virală, celula-gazdă furnizează odată cu materialul de construcție și cele mai multe funcții pentru biosinteza de virus nou. Unele enzime specific virale, care nu se găsesc în mod normal în celulele infectate, ca și proteinele capsidale sînt sintetizate utilizînd informația genetică virală sub formă de ARNm sintetizat după ce s-a produs infecția.

Sinteza ARNm viral reprezintă, de aceea, o etapă esențială în replicarea virală și în evoluția infecției virale, deoarece, odată cu formarea lui, acțiunea directă a virusului infectant se termină, exceptînd micile modificări posibile în funcționarea aparatului celular de traducere a noii informații genetice. Spre deosebire de celula normală în care totdeauna ARNm este transcris după un model ADN, în celulele infectate cu virusuri, acest proces se realizează într-o gamă largă de mecanisme și alternative diferite, în funcție de tipul de virus și în special de natura materialului genetic ADN sau ARN, dublu catenar sau monocatenar, și mai ales în funcție de polaritatea materialului genetic (fig. 40).

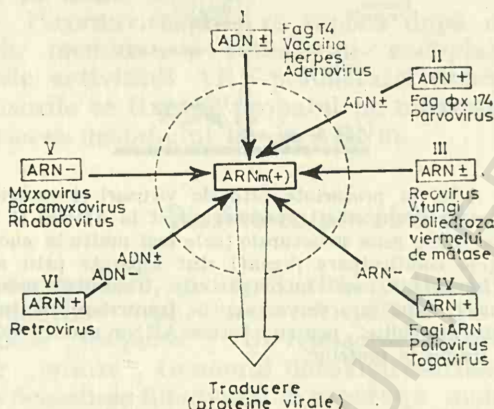


Fig. 40. — Clasificarea sistemelor genetice virale în funcție de complementaritatea lor față de ARNm.

Polaritatea acizilor nucleici virali. În mod convențional, se consideră că ARNm funcțional de mesaj, care conține tripletele codificatoare și se poate lega eficient de ribosomi, asigurînd traducerea informației genetice, are o polaritate sau complementaritate pozitivă « + » (Baltimore, 1971).

Studiul genetic al picorna- și togavirusurilor a arătat că genomul ARN m.c. se poate combina cu ribosomii celulari, putînd servi ca ARNm: informația genetică necesară pentru producerea de virus progen poate fi tradusă direct de la el. În opoziție cu acestea, ARN din mixo- și rhabdovirusuri trebuie mai întîi transcris la catene cu complementaritate opusă și numai acestea pot fi traduse la nivelul ribosomilor celulari.

Pornind de la aceste observații, Baltimore (1971) recomandă să se noteze, prin analogie, cu « + » complementaritatea acizilor nucleici virali de același tip cu aceea a ARNm (de ex. *Picorna-*, *Togavirus)* și cu « — » polaritatea de sens opus sau de tip antimesager (ex. *Myxovirus*). Cu alte cuvinte, ARN notat cu « + » are o polaritate pozitivă, este de tip ARNm

și ca atare este direct traductibil într-un sistem celular. ARN notat cu « — » are o polaritate negativă, este de tip antimesager (complementar față de ARNm) și, ca urmare, nu este traductibil direct într-un sistem acelular. În cazul acizilor nucleici dublu catenari, complementaritatea se notează cu „plus — minus" « ± » pentru ADN, catena « + » fiind cea care conține secvența de baze echivalentă cu aceea a ARNm. În cazul ADN viral d.c. sinteza ARNm se desfășoară direct, ca în celula normală.

În funcție de aceste criterii și de modul de formare a ARNm în celulele infectate au fost descrise șase clase de sisteme genetice virale (Baltimore, 1971), (fig. 41):

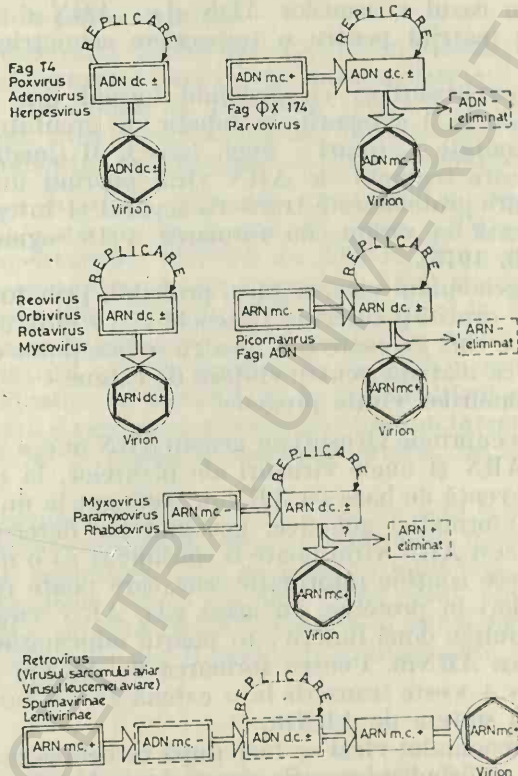


Fig. 41. — Scheme de replicare a genomurilor virale.

Clasa I cuprinde virusuri bacteriene (fagul T4) și animale (*Vaccina, Herpes-, Adeno-* și *Papovavirus*), cu sisteme genetice analoge celor ale celulei-gazdă — respectiv cu genom ADN d.c. Aceste virusuri, ca și celulele-gazdă fac sinteza de ARNm prin transcrierea asimetrică (a uneia din catene) a acidului nucleic genomic.

Clasa a II-a este formată din virusuri (fagul Φ X 174, *Parvovirus* etc.) cu genom ADN m.c. « + », avînd deci aceeași polaritate ca și ARNm. Transcrierea se realizează prin conversia ADN viral (ADNv) la ADN d.c. « ± », care apoi servește ca matriță pentru sinteza ARNm.

Replicarea genomului viral se face cu ajutorul unei enzime din celula-gazdă, care dirijează sinteza unei catene de ADN adiacentă şi complementară « + » celei virale « — », determinînd producerea unei molecule de ADN d.c. « ± » (forma replicativă). Aceasta serveşte ca matriţă pentru sinteza de noi catene de ADN « + » care sînt utilizate ca genomuri virale progene şi ca ARNm pentru sinteza de proteine virale.

Clasa a III-a cuprinde virusuri cu genom ARN d.c. « ± » patogene pentru fungi *(Penicillium, Aspergillus)*, plante (nanismul orezului „Rice-dwarfvirus"), insecte (poliedroza citoplasmatică a viermilor de mătase „Silkworm") şi vertebrate *(Reovirus* — virusuri respiratorii, enterice umane). Ca şi în cazul virusurilor ADN d.c., ARN d.c. « ± » genomic viral serveşte ca matriţă pentru o transcriere asimetrică şi formare de ARNm « + ».

În cazul reovirusurilor, cu genomul format din 10 segmente de ARN d.c., grupate în 3 categorii, în funcţie de greutatea moleculară şi lungimea lor şi notate L (mari — engl. *large)*, M (medii) şi S (mici — engl. *small)*, fiecare segment de ARN viral purtînd informaţia pentru sinteza unei singure proteine este transcris separat şi integral de o ARN-polimerază prezentă în virion, cu formarea a 10 segmente de ARNm (Burke şi Russell, 1975).

Replicarea genomului viral se face, probabil, prin formare de catene « + » şi « — », în cantităţi diferite. Catenele « + » sînt utile în cantităţi mai mari deoarece sînt necesare atît pentru a funcţiona ca ARNm, cît şi pentru a acţiona ca matriţă pentru sinteza de catene « — » şi a fi incluse în structura genomurilor virale progene.

Clasa a IV-a cuprinde virusuri cu genom ARN m.c. « + » ca *Picorna-, Togavirus*, fagii ARN şi unele virusuri ale plantelor, la care ARN viral este identic ca secvenţă de baze cu ARNm. Adăugat la un sistem acelular de traducere a informaţiei genetice, genomul lor determină sinteza de proteine virale. Acest ARN viral poate fi considerat ca o moleculă gigantă de ARNm, deoarece conţine informaţie-sens, care poate fi direct tradusă la ribosomii celulari în proteine. În acest caz, ARN viral este infecţios şi îndeplineşte simultan două funcţii : a) poartă informaţie genetică virală şi b) acţionează ca ARNm. Pentru formarea de ARNm în celula infectată, ARN viral « + » este transcris la o catenă « — », care apoi serveşte ca matriţă pentru sinteza de ARNm.

Replicarea genomului viral se face după ce celula-gazdă a sintetizat o ARN-replicază, utilizînd informaţia genetică virală, şi constă în sinteza unei catene de ADN « — » complementară faţă de ARN « + » infectant şi infecţios. În cursul acestui proces, catenele «+ » şi «— » se asociază pentru a forma o moleculă de ARN d.c. « ± » „forma replicativă", care poate fi analogă celei descrise la fagul Φ X 174). În această formă replicativă, ARN « — » acţionează ca matriţă pentru a dicta secvenţa de baze a unor noi catene de ARN «+ » care îndeplinesc două funcţii : a) acţionează ca ARNm pentru formarea de noi proteine virale ; b) pot fi incorporate ca ARN genomic, infecţios, în particulele de virus progen.

Clasa a V-a cuprinde virusuri *(Myxo-, Paramyxo-, Rhabdovirus)* cu o secvenţă de baze complementare faţă de aceea a ARNm necesar pentru sinteza proteinelor ARN viral, avînd deci polaritatea « — ». Ca

urmare, acest genom nu poate acţiona ca ARNm în celulele infectate: în prezenţa unui sistem de traducere a informaţiei genetice nu dirijează sinteza de proteine virale. În acest caz, ARN viral este neinfecţios, pentru că în celula animală neinfectată nu există nici un mecanism care să asigure sinteza corectă a proteinelor, folosind ca model o catenă « — ». *In vivo*, în celulele infectate, el este mai întîi transcris la ARN cu polaritate opusă « + » cu secvenţă complementară celui din virion (ARNc), sub efectul unei enzime prezente în virion, care poate controla transcrierea ARN virale. Prezenţa transcriptazei virale este determinată de necesitatea ca informaţia prezentă în ARN viral de polaritate «— » să fie transcrisă la ARNc pentru a se putea exprima.

Replicarea genomului viral se face după un mecanism încă necunoscut. Teoretic, ea implică formarea unei catene intermediare « + » sub acţiunea ARN-polimerazei preformate în particula virală şi introdusă în celulă odată cu ARN viral. Rolul exact al catenei intermediare în replicare este necunoscut. În momentul morfogenezei ea este îndepărtată.

Clasa a VI-a cuprinde virusurile oncogene cu genom ARN m.c. (oncornavirusurile), care au, ca şi cele din clasa a IV-a, o secvenţă de baze şi o complementaritate identică cu ARNm. În acest caz, genomul viral « + » are o comportare cu totul specială, fiind transcris iniţial de o transcriptază inversă din virion, la ADN m.c. şi apoi la ADN d.c. « $\pm$ », care se poate integra în genomul celulei-gazdă. În continuare, ADN d.c. poate servi ca matriţă pentru transcriere la ARNm sau la ARN viral progen (care sînt identice ca secvenţă de baze, dar diferă ca mărime), asigurînd în felul acesta şi replicarea genomului viral sau integrarea în genomul celular, care duce fie la starea de purtător criptic, fie la transformarea malignă a celulei.

În cazul oncornavirusurilor, ARN viral nu este infecţios, deoarece celula-gazdă nu posedă enzime de tipul transcriptazei inverse virale. Chiar în cazurile în care replicarea ADN precede cu mult faza de morfogeneză şi formare a particulelor virale mature, ca în cazul virusului vaccinei, moleculele de ADN progene rămîn localizate în celulă formînd un „depozit" („virosom") din care vor fi preluate la întîmplare şi incorporate în particule de virus progene.

Biosinteza proteinelor „tardive"

Proteinele tardive („late proteins") sintetizate după amorsarea replicării genomului viral şi codificate de informaţia genetică (ARNm) tardivă sînt în cea mai mare parte proteine structurale, de capsidă, unele proteine enzimatice şi de reglare, care controlează expresia genelor „timpurii", precum şi proteine nestructurale care asigură desfăşurarea reacţiilor legate de morfogeneză şi eliberarea virusului din celulă. În cursul biosintezei proteinelor tardive are loc şi replicarea genomului viral.

Cantitatea de proteine tardive este totdeauna mai mare decît aceea a proteinelor precoce, deoarece există mai mult ARNm tardiv, numărul genomurilor progene fiind mult mai mare decît al celor parentale.

De cele mai multe ori, activarea porţiunii de genom cu funcţii tardive este însoţită de stoparea funcţiilor „timpurii". În aceste cazuri, uneori, intervine un mecanism de reglare care face ca setul de gene precoce să fie transcris de la genomurile parentale, în timp ce setul de gene tardive este transcris numai de la genomurile progene. Acest mod de reglare s-ar realiza prin specificitatea de acţiune a enzimei sau enzimelor care fac transcrierea ADN.

La unii bacteriofagi s-a demonstrat că ARN-polimeraza dependentă de ADN prezentă în celula-gazdă este modificată la începutul infecţiei virale în aşa fel încît nu poate transcrie decît funcţiile timpurii ale genomului fagic, pentru ca la începutul perioadei tardive specificitatea să fie modificată din nou, în aşa fel încît acţionează numai asupra funcţiilor tardive ale genomului. Probabil că mecanisme similare acţionează în cazul altor virusuri.

Durata perioadei de biosinteză a proteinelor tardive este în general limitată de capacitatea celulei-gazdă de a furniza energia necesară sintezelor respective. În mod obişnuit, interferenţa infecţiei virale cu funcţiile celulei-gazdă are ca urmare încetinirea sintezei de acizi nucleici şi proteine virale, fapt care limitează cantitatea de virus progen produs.

Morfogeneza virusurilor

Morfogeneza (asamblarea sau maturarea) virusurilor reprezintă procesul prin care, încă în faza de sinteză a proteinelor tardive, genomurile nou formate şi polipeptidele de capsidă sînt asamblate pentru a forma structura organizată a particulei virale mature. Procesul are multe detalii necunoscute, deoarece asamblarea *in vivo* se realizează extrem de rapid şi diferitele etape sînt greu de observat în celulele infectate. Cele mai multe informaţii se referă la observaţii *in vitro*, care diferă foarte mult sub raportul condiţiilor de realizare în organism.

Spre deosebire de dezvoltarea organismelor, formarea structurii virusurilor nu este controlată prin activarea secvenţială a unor gene. Structurile virale specifice sînt asamblate pornind de la un amestec de diferite sorturi de proteine-precursor, care sînt disponibile simultan. Deoarece, cel puţin în cazul *virusurilor mai mari*, asamblarea necesită o succesiune particulară în procesul de adiţie a diferitelor proteine, una din problemele fundamentale ale morfogenezei virusurilor este aceea a menţinerii acestei ordini.

În cazul *virusurilor mici*, se pare că direcţiile de asamblare a materialului capsidei sînt o consecinţă a însăşi conformaţiei constituenţilor săi, a proprietăţilor lor de legare şi de geometrie, care sînt suficiente pentru a construi o anumită formă definită. Ca urmare, proteinele acestor virusuri se pot lega spontan, formînd o structură organizată printr-un proces de *autoasamblare*. Această proprietate este ilustrată şi de prezenţa la unele virusuri icozaedrice mici a unor particule virale goale, care nu conţin acid nucleic şi care nu pot fi deosebite de cele mature. Morfogeneza prin autoasamblare cu un număr limitat de gene şi o morfologie simplă, care nu pune probleme complicate de reglare, reprezintă un caz parti-

cular al interacţiunilor dintre macromolecule şi în special al interacţiunii proteină— proteină şi proteine— acizi nucleici.

Virusurile mai complexe, caracterizate prin diversificarea tipurilor de proteine şi o complexitate morfologică corespunzătoare, au procesul de asamblare mult mai complicat şi mai dificil (fig. 42). În multe cazuri, aceste virusuri apar iniţial în forme precursor instabile, care se transformă ulterior în particule virale mature cu un mare grad de rezistenţă chimică şi mecanică (Showe, 1975).

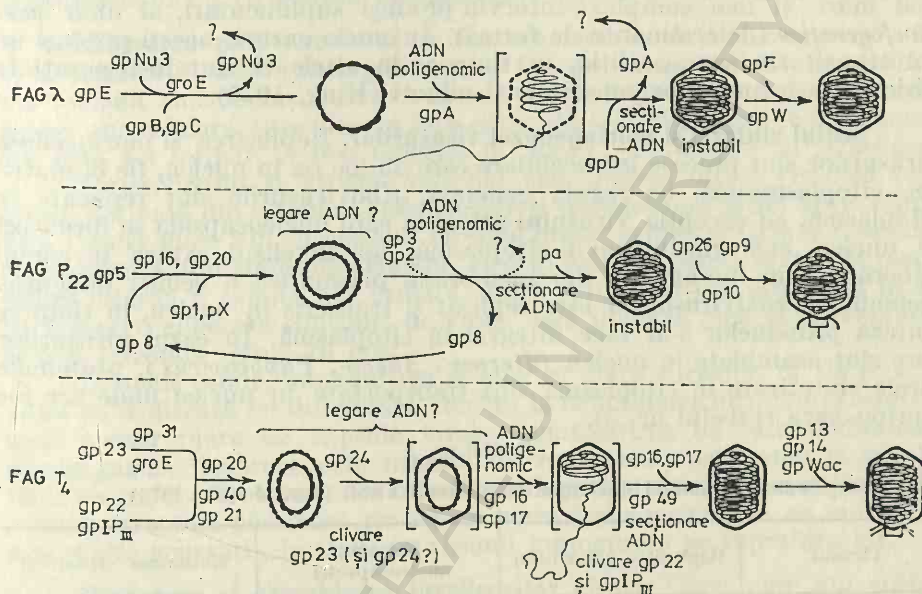


Fig. 42. — Reprezentarea schematică a căilor de asamblare a capetelor fagilor λ, P22 şi T4; „gp" inaintea denumirii unei gene (număr sau literă) indică produsul proteic al acesteia (după Casjens şi Klug, 1975).

Studiind procesul de morfogeneză la fagul T4, Kellenberger (1976) a stabilit două faze majore în evoluţia acestuia, în linii mari extrapolabile şi la celelalte virusuri mai mari şi cu structură mai complicată:

a) *Faza de asamblare*, în cursul căreia se produce o particulă-precursor (*precapsidă-provirion* sau în cazul fagului „precap"), în care de multe ori o proteină specială — „proteina de eşafodaj" („Scaffolding-protein") formează un „corp central" ce serveşte ca un adevărat „cofrag" pe care este asamblată capsida proteică.

b) *Faza de maturare*, care urmează celei de asamblare, evoluînd în etape mai mult sau mai puţin complexe, sub raportul numărului şi naturii proceselor care o formează, variabilă de la un grup de virusuri la altul. În această fază au loc pătrunderea acidului nucleic în precapsidă, îndepărtarea proteinelor de eşafodaj sau modificarea lor profundă pe cale enzimatică, în unele cazuri adăugarea unor proteine

interne minore și, în final, transformarea precapsidei labile într-o capsidă stabilă, ca rezultat al interacțiunilor cu proteinele capsidei și/sau cu unii componenți interni ai virionului. În această fază are loc și o condensare locală a ADN, care la fagul T4 este de 10—15 ori mai mare decît a genomului vegetativ, precum și o mărire a volumului, care în cazul capului de fag T4, corespunde unei măriri cu 10—20 % a volumului respectiv.

În timp ce la virusurile cele mai simple forma și dimensiunile virionului rezultat din autoasamblarea unor proteine identice sînt determinate de geometria și proprietățile de legare ale acestora, în cazul virusurilor mai mari și mai complexe intervin produși suplimentari, ai unor *gene morfogenetice* (determinante de formă). În unele cazuri, acești produși au rol tranzitoriu sau catalitic, în timp ce în altele ei sînt încorporați în virion sub forma unor constituenți minori (King, 1975).

Sediul sintezei și morfogenezei virusurilor. Replicarea și morfogeneza virusurilor sînt procese intracelulare care au loc fie în nucleu, fie în matricea citoplasmatică. Ca regulă generală, ribovirusurile sînt replicate în citoplasmă, cu excepția virusului gripal la care nucleocapsida se formează în nucleu, hemaglutininele în citoplasmă, iar învelișul extern în cursul eliberării prin înmugurire din membrana plasmatică a celulei infectate. Genomul dezoxivirusurilor este replicat și transcris în nucleu, în timp ce sinteza proteinelor s-ar face integral în citoplasmă. În cazul virusurilor care sînt asamblate în nucleu (*Herpes-*, *Adeno-*, *Papovavirus*), proteinele virale sintetizate în citoplasmă sînt transportate în nucleu unde are loc morfogeneza (tabelul nr. 5).

Tabelul nr. 5

Sediul biosintezei diferiților constituenți virali (după Joklik, 1974)

Virusul	Replicarea genomului	Formarea nucleocapsidei	Maturarea virionului
Poxvirus	citoplasmă	citoplasmă	citoplasmă
Herpesvirus	nucleu	nucleu	membrana nucleară și citoplasmatică
Adenovirus	nucleu	nucleu	nucleu
Papovavirus	nucleu	nucleu	nucleu
Poliovirus	citoplasmă	citoplasmă	citoplasmă
Togavirus	citoplasmă	citoplasmă	membrane celulare
Reovirus	citoplasmă	citoplasmă	citoplasmă
Orthomyxovirus	nucleu	nucleu (?)	membrane celulare
Paramyxovirus	citoplasmă	citoplasmă	membrane celulare
Rhabdovirus	citoplasmă	citoplasmă	membrane celulare
Oncornavirus	nucleu	citoplasmă	membrane celulare

Eliberarea particulelor virale progene din celulă

Acest proces evoluează deseori cu particularități proprii diferitelor virusuri. În general, virusurile mai mici sînt eliberate mai ușor decît cele mari (*Poxvirus*), care au tendința să fie adesea reținute perioade îndelungate în celulele în care s-au multiplicat. În timp ce virusurile cu ADN (cu excep-

ţia virusului herpesului) tind să fie reţinute în celule, chiar după apariţia efectului citopatic şi de aceea sînt eliberate cu frecvenţă relativ mică sau moderată, virusurile cu ARN sînt eliberate masiv.

Eliberarea virusurilor se poate face rapid şi exploziv, prin ruperi mecanice (în modul cel mai brutal la bacteriile infectate cu fagi care, practic, „explodează"), sau lent şi controlat, prin străbaterea membranei celulare, a cărei permeabilitate este mărită în urma alterărilor morfologice produse de virus. În unele cazuri, virusul trece direct de la o celulă la alta adiacentă; alteori, infecţia unor celule noi este condiţionată de trecerea prealabilă a virusurilor în afara celulei-gazdă în care au fost produse.

Eliberarea prin exocitoză ia frecvent forma de „înmugurire", fie spre exteriorul membranei plasmatice, fie spre interiorul ei; în ultimul caz virionii sînt incluşi într-o veziculă intracitoplasmatică derivată din membrana celulară, care ulterior este eliberată prin fuzionare cu membrana din care s-a format. A fost descrisă la *Myxo-*, *Paramyxo-* şi *Arbovirus*.

Herpesvirusul şi virusul vaccinal sînt închise într-o veziculă (cisternă) derivată din reticulul endoplasmic şi transportate astfel spre suprafaţa celulei unde vin în contact cu membrana celulei. Printr-o deschizătură apărută în membrana celulară, virusul iese din celulă învelit în membrana internă a celulei. Ca urmare, după aproximativ 6 ore de la infecţie începe o eliberare continuă de virus, care durează pînă la degenerarea celulei infectate (circa 10 ore).

În unele celule, înmugurirea se face cu mare eficienţă, în timp ce în altele se realizează cu dificultate, ducînd la acumularea intracitoplasmică a unui număr mare de capside virale. Înmugurirea nu este dăunătoare celulei-gazdă, deoarece este urmată de repararea membranei la nivelul unde s-a produs. În cazul unor infecţii virale persistente (oreion, rujeola etc.) celulele infectate păstrează un aspect normal şi continuă să se multiplice mai multe generaţii, în timp ce virionii înmuguresc pe suprafaţa lor.

Biogeneza şi asamblarea învelişurilor virale. După cum am arătat, învelişurile virale se formează în momentul în care virionii „înmuguresc" prin membrana plasmatică a celulelor infectate sau la suprafaţa internă a unor vezicule intracelulare.

Formarea învelişului viral este un proces care decurge în mai multe etape succesive, ce duc la încorporarea unor proteine specifice virale în membrana celulară. Faza iniţială este reprezentată de biosinteza glicoproteinelor de membrană. Lanţul lor polipeptidic este sintetizat la nivelul polisomilor legaţi de membrane, de la care migrează pe calea reticulului endoplasmic neted şi a aparatului Golgi pînă la nivelul membranei plasmatice. În cursul acestei migrări polipeptidele virale suferă modificări care implică glicozilarea lor (care se produce atît la nivelul reticulului endoplasmic rugos, cît şi la nivelul membranelor interne netede) şi clivarea lor proteolitică (la nivelul membranelor netede interne şi al membranei plasmatice). Lanţurile laterale de carbohidraţi sînt sintetizate *de novo* în cursul infecţiei, iar glicozilarea este efectuată de enzimele (glicoziltransferazele) celulei-gazdă (Rott şi Klenk, 1977).

După formarea lor, glicoproteinele virale care vor forma spiculele virionului se inseră în membrana plasmatică celulară, înlocuind proteinele normale preexistente, devenind proeminente la suprafaţa membranei

(Stanley, 1973; Klenk, 1974). Spiculele (hemaglutinine ş.a.) se formează printr-o rearanjare extensivă a glicoproteinelor care inserate iniţial la întîmplare sînt adunate în zone circumscrise, datorită mobilităţii lor mari, în planul membranei celulare (Nagai, 1975).

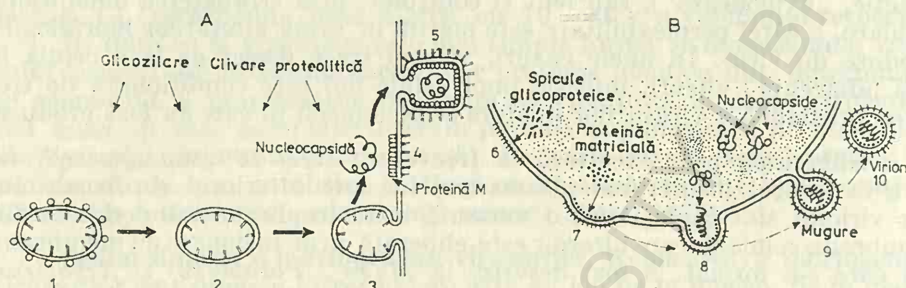


Fig. 43. — Morfogeneza învelişului viral. A. Lanţurile polipeptidice ale glicoproteinelor sintetizate pe reticulul endoplasmic, rugos (RER) (1) migrează pe calea reticulului endoplasmic neted (REN) şi a aparatului Golgi (2) pînă la membrana plasmatică. În cursul migrării, polipeptidele suferă modificări consecutive traducerii informaţiei genetice; glicozilarea secvenţială în RER şi REN precum şi clivarea proteolitică la nivelul membranelor interne netede şi al membranei plasmatice (3). Proteina M se leagă de zona din membrana plasmatică în care sînt localizate glicoproteinele virale. Se formează „petice" de înveliş viral capabile să lege nucleocapsidele care „plutesc" în citoplasmă (4). Virusul matur este eliberat prin înmugurire (5). B. Fazele procesului de înmugurire: glicoproteinele virale înlocuiesc proteinele membranare ale celulei-gazdă (6). Proteina matricială (7) şi nucleocapsida (8) pătrund în mugurele pe cale de formare. Virionul este eliberat (10) prin strangularea mugurelui (9), după care integritatea membranei celulare se reface imediat (după Rott şi Klenk, 1977).

În faza următoare, proteinele M specific virale se deplasează spre faţa internă a membranei celulare unde se inseră sub forma unui strat subiacent zonei în care se găsesc încorporate glicoproteinele (Nagai şi colab., 1976). Nu se cunoaşte mecanismul prin care proteinele M recunosc zona respectivă (fig. 43).

După încorporarea proteinelor M se formează la nivelul membranei celulare „petice" delimitate, care conţin proteine specific virale, spre deosebire de regiunile adiacente care rămîn în structura normală a membranei. „Peticele" reprezintă precursorii imediaţi ai învelişului viral, deoarece odată formate sînt capabile să lege nucleocapsidele care „înnoată" în citoplasmă (Shimizu şi Ishida, 1975). Învelişul viral este deci derivat dintr-un „petic" al membranei plasmatice, modificat prin încorporarea de proteine specifice virale. Nu se cunosc factorii care antrenează protruzia „peticelor" pentru a forma mugurele. Este probabil că, iniţial, un rol important ar avea proteinele M şi, ulterior, mai ales nucleocapsidele.

O modalitate caracteristică de înmugurire a fost descrisă la virusul stomatitei veziculare (VSV), care este acoperit de o membrană cu compoziţie lipidică tipică pentru membrana celulei-gazdă, la care se adaugă proteine specific virale.

În cursul replicării virusului, proteinele G formează un strat dens care acoperă faţa internă a membranei celulare la nivelul la care va avea loc înmugurirea, în timp ce proteinele M (ale matricei virale) sintetizate

ca proteine solubile în citoplasmă și deplasate ulterior tot la periferia celulei servesc ca o punte, formînd legături încrucișate care leagă nucleocapsida VSV de capătul citoplasmic al proteinei G (fig. 44). Ca rezultat al interacțiunii atractive între acești constituenți, o parte mai mare din membrana

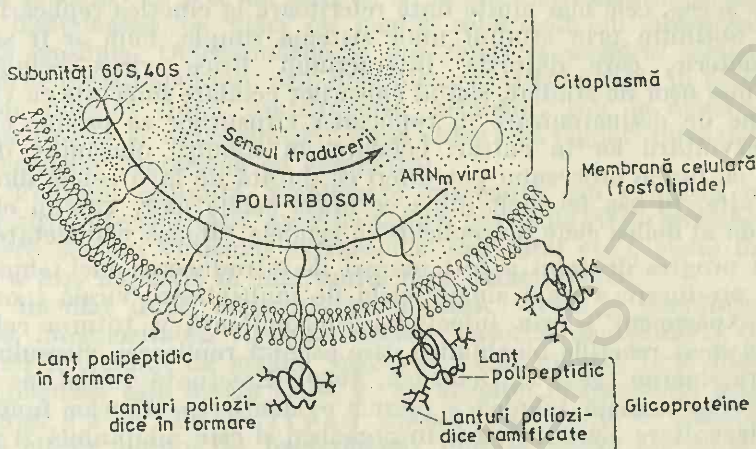


Fig. 44.—Mecanismul molecular al formării glicoproteinelor învelișului viral. Pe măsură ce sînt sintetizate, lanțurile polipeptidice sînt glicozidate și se înseră în membrana celulară (după Girard și Hirth, 1980).

celulară este „înfășurată" în jurul capsidei VSV și este „cusută" pe loc în poziția respectivă de proteine M. În cele din urmă, nucleocapsida este complet acoperită și iese din celulă, ca și cum ar fi fost trasă în membrana celulară prin legăturile încrucișate ale proteinei de matrice M (Lodish și Rothman, 1979).

Eliberarea virusurilor care nu „înmuguresc" din celule, înainte de liza acestora, se face printr-un mecanism necunoscut.

În unele cazuri *(Poliovirus)* se acumulează în cantități mari — mii de particule virale — în citoplasma celulei-gazdă și se eliberează brusc printr-o adevărată „explozie" celulară, în alte cazuri se eliberează lent, ca o trecere prin sită, înainte de moartea definitivă a celulei. În organismele infectate pot apărea și situații mai diferite, de exemplu, fagocitarea celulelor legate de către macrofage, furnizînd prin aceasta un mecanism adițional de diseminare a virusului progen.

Mecanisme similare proceselor de exocitoză, trecere prin pori sau direct prin membranele nucleare (eventual prin ruperea lor), asigură transportul constituenților virali din nucleu spre citoplasmă. În unele cazuri, nucleocapsidele se pot acoperi cu un înveliș derivat din membrana nucleară în cursul acestui transport, printr-un fenomen similar celui de „înmugurire" descris pentru membrana plasmatică.

Cinetica replicării virusurilor

Dinamica replicării în organism este greu de studiat nu numai din cauza dificultăților tehnice, ci și a faptului că decurge desincronizat și în cicluri succesive. Cînd un virus infectează un organism el își desfășoară ciclul

inițial de multiplicare într-un număr limitat de celule, pornind de la care ciclul se repetă de mai multe ori succesiv, prin infectarea altor celule, încetînd odată cu întreruperea replicării virale prin intervenția reacțiilor de apărare ale gazdei sau moartea acesteia.

De aceea, cele mai multe date referitoare la cinetica replicării virale au fost obținute prin studiul unor sisteme simple, cum ar fi sistemul fag — bacterie, care datorită interacțiunii litice virus—celulă-gazdă este cel mai ușor de studiat, sau al culturilor celulare infectate cu virusuri. Fenomene de desincronizare în replicarea virusurilor se produc chiar în cazul dezvoltării lor în culturi celulare, în condiții obișnuite, datorită faptului că fazele procesului pot diferi ca durată de la o celulă din populație la alta, în așa fel încît după ce unele celule mor, virionii eliberați inițiază un al doilea ciclu de replicare în celulele rămase neinfectate.

Un progres deosebit a fost marcat de introducerea unei tehnici speciale de producere a unui singur ciclu de multiplicare virală („one-step growth experiment") prin infectarea concomitentă a tuturor celulelor, în așa fel încît reacțiile biochimice care asigură replicarea virusului să se desfășoare sincron (Ellis și Delbruck, 1939). Efectuată inițial pe cuplul fag—bacterie, această tehnică a permis evidențierea etapelor fundamentale de dezvoltare ale unui virus în organism și este adaptabilă și pentru studiul replicării virale în celulele animale și vegetale (fig. 45).

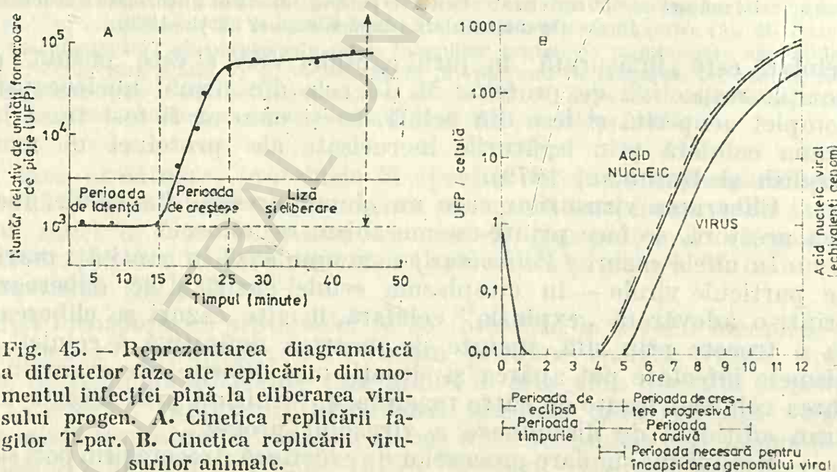


Fig. 45. — Reprezentarea diagramatică a diferitelor faze ale replicării, din momentul infecției pînă la eliberarea virusului progen. A. Cinetica replicării fagilor T-par. B. Cinetica replicării virusurilor animale.

Ciclul de multiplicare virală este reprezentat de intervalul de timp cuprins între pătrunderea virionilor în celulă și eliberarea de virus progen.

Condiția esențială pentru studiul unui singur ciclu de multiplicare a virusului constă în a evita ca virionii progeni rezultați din primul ciclu de replicare să infecteze noi celule și să declanșeze un al doilea ciclu de replicare. Acest deziderat se poate realiza pe mai multe căi. Una dintre acestea constă în infectarea celulelor-gazdă cu un număr mic de virioni, urmată, pentru a împiedica inițierea altor cicluri de replicare virală, fie de o diluare masivă a culturii, fie de adăugarea unor inhibitori capabili să blocheze receptorii celulari de virus.

O tehnică mai simplă constă în infectarea masivă, în același timp, a *tuturor* celulelor cu o doză mare de virus, care nu va permite decît evoluția unui singur ciclu de replicare. După inoculare, se recoltează probe la intervale fixe de timp și se determină numărul de fagi prezenți prin diseminarea pe plăci cu mediu solidificat, în prezența celulelor-gazdă sensibile. Determinările se pot referi la *numărul virionilor extracelulari* eliberați spontan, prin determinarea titrului fagic în lichidul supernatant obținut după centrifugarea celulelor, sau la *numărul total al fagilor* (intra- și extracelulari), după eliberarea fagilor intracelulari (prin liza celulelor bacteriene cu cloroform).

Folosind anumite evenimente marcante din evoluția unui virus (dispariția infecțiozității, apariția primei particule virale progene, dinamica creșterii titrului virusului extracelular sau total etc.), ciclul de multiplicare a fost împărțit în mai multe faze caracteristice.

Imediat după adsorbția particulelor virale și pătrunderea lor în celule, infecțiozitatea virusului dispare datorită decapsidării virionilor și trecerii în stadiul de genom vegetativ (acid nucleic viral liber) a cărui infecțiozitate este foarte slabă și, ca urmare, nedecelabilă prin tehnicile curente. Faza de eclipsă durează în funcție de natura virusului de la cîteva minute (la bacteriofagi) pînă la cîteva ore (5 la *Poxvirus*, 10–12 la *Herpesvirus*), corespunzînd în mare parte perioadei precoce a ciclului de multiplicare virală ale cărui evenimente biochimice pregătesc perioada de replicare a genomului viral. Apariția primului genom viral progen marchează începutul perioadei de sinteză a proteinelor „tardive'' care va continua un număr de ore variabil de la un virus la altul.

La sfîrșitul perioadei de eclipsă nu se poate detecta virusul în mediul extracelular, dar titrul virusului *total* (intra- și extracelular) ajunge la nivelul concentrației virale corespunzînd momentului infectării celulelor.

Apariția primei particule de virus matur extracelular marchează debutul perioadei de creștere („rise period''), care corespunde începutului unei creșteri exponențiale a virusului.

Intervalul de timp cuprins între momentul infectării celulelor și acela în care virusul *extracelular* atinge concentrația inițială reprezintă perioada de latență a ciclului de replicare. Din figura 45 reiese că perioada de eclipsă se suprapune peste perioada de sinteză a proteinelor „timpurii'' și începutul perioadei tardive. Intervalul de timp cuprins între începutul fazei tardive și debutul perioadei de creștere a numărului virionilor reprezintă timpul necesar pentru încorporarea genomului viral (încapsidarea) în particula de virus matur.

După ce apar primii fagi extracelulari, numărul unităților fagice crește rapid pînă cînd sînt lizate toate bacteriile. Această fază reflectă eliberarea de particule virale mature prin liza celulelor infectate.

Perioada staționară în platou a curbei titrului viral reflectă stoparea proceselor de sinteză, asamblare și eliberare de virus.

Lungimea relativă a diferitelor perioade, ca și gradul de multiplicare a virusurilor sînt foarte diferite, în funcție de natura virusului și a celulelor-gazdă.

Durata totală a ciclului de multiplicare, diferită de la un virus la altul, variază în funcție de condițiile de mediu și de natura celulelor-gazdă, fiind cuprinsă între 20–60 minute la fagi, 6–8 ore la *Poliovirus*,

~10 ore la *Rhabdo-* şi *Togavirus*, 15 ore la *Reovirus*, 12—30 ore la *Herpesvirus*, 18—36 ore la *Myxovirus*, 24 de ore la *Poxvirus* şi 48 de ore la *Adeno—* şi *Papovavirus* (tabelul nr. 6, fig. 46).

Ca regulă generală, virusurile cu ARN « + » se multiplică mai repede decît cele cu ARN « — », iar acestea mai repede decît retrovirusurile, care se replică după schema ARNv→ADNmc→ADNdc→ARNv.

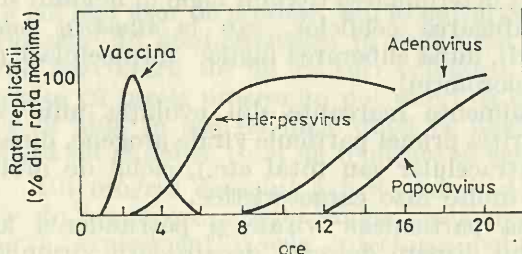


Fig. 46. — Dinamica şi durata ciclului de replicare la unele virusuri animale (după Joklik, 1976).

Randamentul multiplicării virusului poate fi apreciat prin numărul virionilor existenţi la sfîrşitul ciclului, raportat la numărul particulelor virale iniţiale. El este variabil, putînd oscila de la cîteva zeci de particule

Tabelul nr. 6

Durata aproximativă a perioadei de eclipsă şi a ciclului integral de multiplicare ale citorva virusuri (Joklik, 1974)

Virusul	Perioada de eclipsă (ore)	Durata totală a ciclului de multiplicare (ore)
Poxvirus (Vaccina)	4	24
Herpes simplex virus	3—5	12—30
Adenovirus	8—10	48
Papovavirus (poliom)	12—14	48
Togavirus (Sindbis virus)	2	10
Reovirus	4	15
Myxovirus (Influenza)	3—5	18—36
Poliovirus	1—2	6—8
Rhabdovirus (v. stomatitei veziculare)	2	8—10

virale progene, pentru o particulă infectantă, la 200 (fagul T2), 800—1 000 *(Herpesvirus)* sau la cîteva mii la fagii filamentoşi, care au un ciclu de multiplicare şi eliberare de virus mult prelungit, datorită incapacităţii lor de a-şi liza celula-gazdă.

Cantitatea totală de virus produsă de celula infectată este neaşteptat de mare şi poate oscila între 1—5 % din masa celulară în cazul dezoxivirusurilor animale şi 40 % în cazul fagilor din seria T-par (Luria şi Darnell, 1968). Aceste date, în raport invers cu durata ciclului de multiplicare a virusurilor respective, reflectă o oprire mult mai precoce a ciclului de multiplicare a virusurilor animale. De menţionat că, în general,

oprirea multiplicării virusurilor se realizează ca urmare a morţii celulelor-gazdă. În cazul mutantelor fagice incapabile de liză, ciclul de multiplicare este mult prelungit, iar randamentul producerii de virus este crescut proporţional.

*

Ţinînd seama de particularităţile de replicare, morfogeneză şi eliberare din celule ale diferitelor categorii de virusuri, în cele ce urmează sînt descrise etapele de dezvoltare ale unor virusuri cu genom ADN sau ARN, care au o importanţă mai deosebită, teoretică sau practică.

Replicarea virusurilor cu genom ADN

Replicarea adenovirusurilor

(Pl. 14, 15)

Infecţiile cu adenovirus uman au trei posibilităţi de evoluţie, în funcţie de natura şi originea celulelor utilizate (Van der Werf şi Girard, 1980): 1) *infecţia productivă*, consecutivă replicării genomului viral şi producerii de virus progen infecţios, caracteristică pentru infecţia celulelor KB şi HeLa de provenienţă umană; 2) *infecţia semiproductivă*, descrisă în cazul celulelor de şobolan în care majoritatea celulelor sînt infectate abortiv şi numai o mică proporţie infectate litic; 3) *infecţia abortivă*, caracterizată prin absenţa replicării genomului viral, care este fragmentat şi integrat în ADN celular. Evoluţia abortivă este caracteristică pentru celulele renale de pui de hamster „BHK 21" (baby hamster kidney).

Pătrunderea în celulă. Adenovirusurile umane se adsorb pe suprafaţa receptorilor de virus, situaţi pe suprafaţa membranei plasmatice celulare, prin intermediul fibrelor alungite care proemină la vertexurile virionului. Există $\sim 10^4$ receptori de adenovirus pe suprafaţa fiecărei celule sensibile. Pătrunderea în celulă se face prin pinocitoză, într-o veziculă fagocitară, sau direct în citoplasmă, şi este însoţită de pierderea pentonilor la nivelul membranei celulare, după care virusul parţial decapsidat este vehiculat spre nucleul celulei prin intermediul citoscheletului. Procesul de decapsidare continuă la nivelul porilor nucleari, după care nucleoidul viral eliberat prin pierderea hexonilor este transferat în nucleu. Transferul se face cu consum de ATP. La sfîrşitul acestui proces, care durează 1—2 ore, complexul ADN viral—proteină terminală este eliberat în nucleoplasma celulei unde are loc transcrierea şi replicare genomului viral (Lomberg-Holm şi Philipson (1979). Întregul proces descris din momentul fixării virusului pe celulă pînă la eliberarea ADN în nucleu durează $\sim$1 oră.

Faza de sinteză a proteinelor precoce precede replicarea ADN viral. În cursul ei are loc exprimarea a 8—20 % din genomul viral, sub forma a cinci unităţi de transcriere precoce. Transcrierea informaţiei genetice are loc în primele două ore după infecţie şi este efectuată de o enzimă identică sau foarte similară ARN-polimerazei din celula-gazdă (Price, 1972). După formarea sa, ARNm suferă o serie de modificări (metilare, adiţia unei extremităţi (secvenţa „cap") 5'-terminală, excizia regiunilor interne *(introni)* lipsite de semnificaţie codificatoare, poliadenilarea 3'-terminală) după care este transferat în citoplasmă (fig. 47, 48).

Proteinele precoce au rol în inhibarea sintezelor celulei-gazdă (respectiv a sintezei ADN, ARN şi a proteinelor celulare), în replicarea genomului viral şi în reglarea exprimării genelor precoce. Ele se prezintă sub forma a 15 lanţuri polipeptidice, dintre care cel puţin unele derivă prin proteoliza parţială a unor polipeptide mai mari (van der Werf şi Girard, 1980).

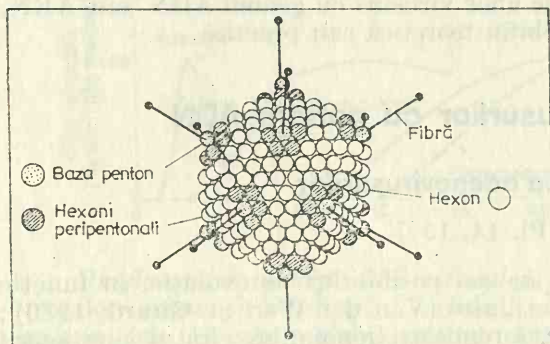
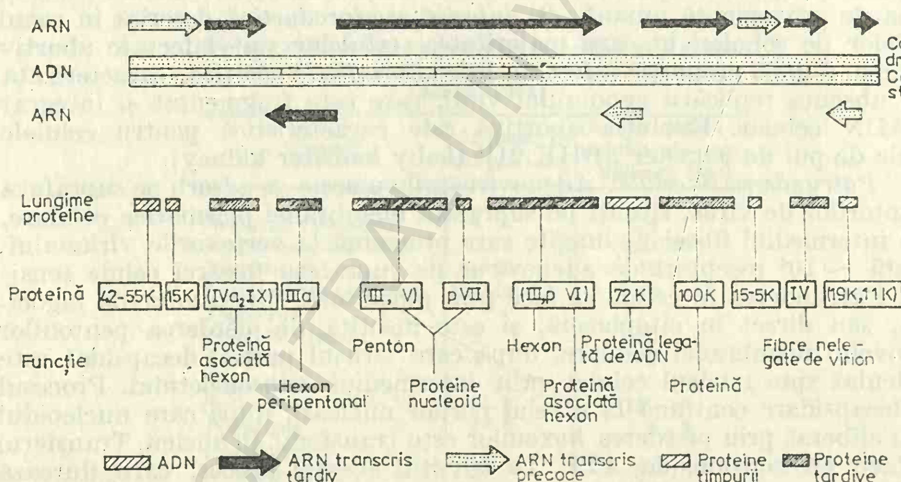


Fig. 47. — Reprezentarea diagramatică a constituenţilor virionului de *Adenovirus*, cu localizarea ARNm precoce şi tardiv, şi semnificaţia proteinelor codificate (după Watson, 1977).



Replicarea genomului viral începe după ~7—8 ore de la infecţie, se realizează cu o viteză maximă după 15—18 ore şi este terminată după 24—30 de ore. În cursul replicării ADN viral se observă inhibarea progresivă a sintezelor proprii celulare. Procesul se desfăşoară în nucleul celular şi are drept rezultat o acumulare în exces de genomuri virale (~ de 10 ori mai mult decît este încorporat în structura virionilor).

Sinteza proteinelor tardive este iniţiată aproape odată cu replicarea ADN viral. În cursul acestei faze, transcrierea ARNm precoce continuă şi este însoţită de apariţia ARNm-tardiv.

Marea majoritate a genelor tardive sînt grupate într-un singur operon transcris după catena „r" („right" = dreaptă) a ADN viral. Produsul primar al acestei transcrieri este o moleculă gigantă de ARNm

tardiv, reprezentînd $> 80\%$ din informaţia genetică virală. Aceasta suferă o serie de modificări ulterioare transcrierii (clivare, legare de acid poliadenilic etc.) pentru a forma moleculele de ARNm-tardiv matur, care este transportat în citoplasmă pentru a fi tradus la ribosomi în proteine (Raskas, 1971).

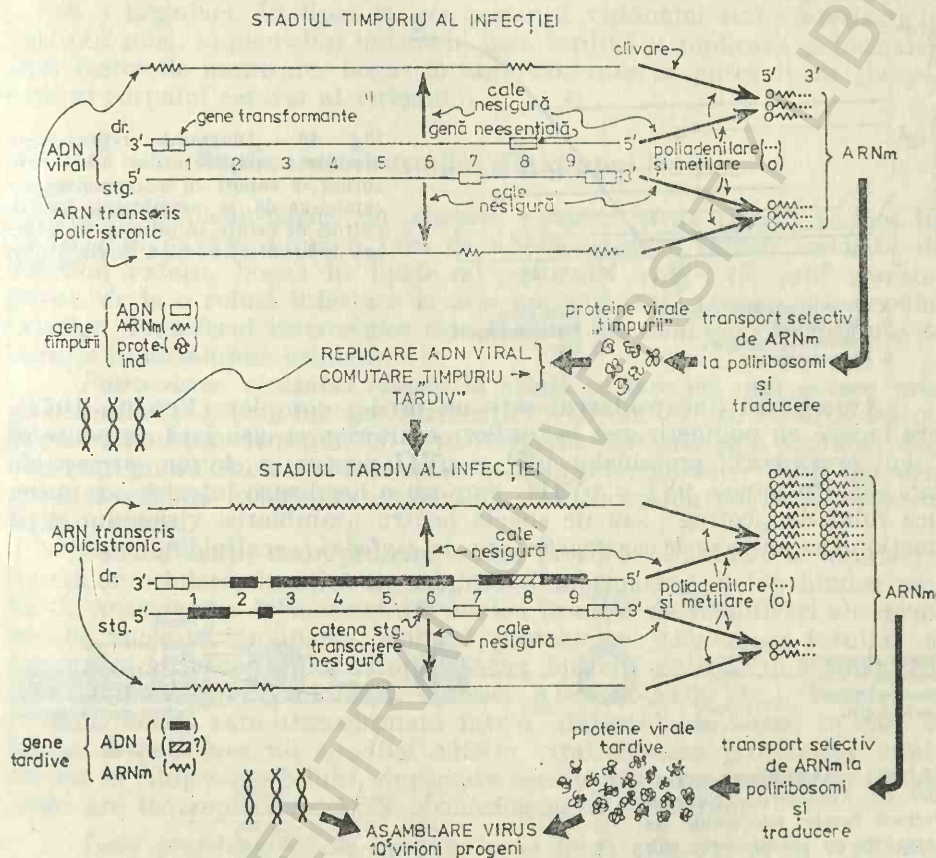


Fig. 48. — Reprezentarea schematică a conceptelor privind exprimarea genelor timpurii şi tardive în cursul infecţiei productive a celulelor umane KB cu *Adenovirus* 2. Virusul pătrunde în celulă şi ADN este eliberat în nucleu. Genele timpurii sînt transcrise la ARNm care este poliadenilat, metilat şi transportat în citoplasmă la poliribosomi, unde este tradus în proteine virale precoce. Proteinele timpurii sînt transportate înapoi în nucleu, unde iniţiază replicarea ADN viral, induc intrarea în funcţiune a genelor virale tardive şi blochează activitatea celor timpurii, precum şi sinteza ADN celular. După ce începe replicarea ADN viral, este declanşată exprimarea genelor timpurii de clasa a II-a şi a celor tardive (majoritatea codifică proteine structurale de virion). Proteinele virale sînt transportate înapoi în nucleu unde sînt asamblaţi virionii progeni (după Wold, Green şi Büttner, 1978).

În cursul fazei tardive are loc sinteza *proteinelor structurale* (proteinele II, III...XII) sub forma unor precursori care suferă ulterior un proces de clivare proteolitică, în cursul asamblării virionului, şi a unei *proteine de maturare* utilizată, de asemenea, în asamblare. Principala proteină structurală este proteina hexonilor, la care se adaugă proteina

bazală a pentonilor, proteina fibrelor și proteinele corpului central al virionului. Proteinele bazei pentonilor apar după două ore, în timp ce proteinele fibrelor și ale hexonilor după 12—16 ore. În unele cazuri, proteinele structurale sînt produse în exces și se acumulează în fazele tardive ale infecției sub formă de cristale proteice în nucleu (fig. 49).

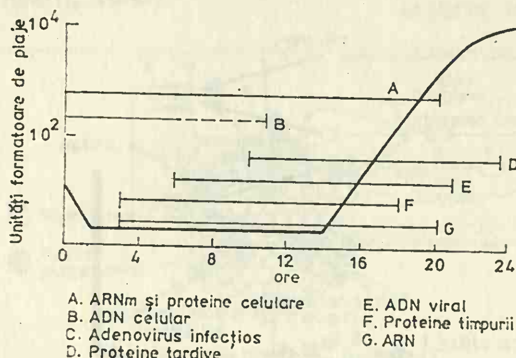
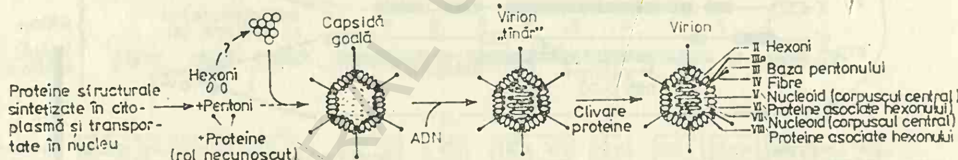


Fig. 49. — Diagramă reprezentînd biosinteza constituenților adenovirusurilor în raport cu macromoleculele celulei-gazdă și asamblarea lor în culturi de celule, în interval de 24 de ore de la infecție (după Davis, 1970).

Asamblarea (încapsidarea) este un proces complex (Pereira, 1974), care începe cu polimerizarea hexonilor ce ulterior se asociază cu pentonii și cu precursorii proteinelor pVI și pVII pentru a forma *precapsida* (fig. 50). Proteinele pVI și pVIII, care au o localizare internă, ar putea juca rolul de „cofrag" sau de schelă pentru asamblarea virionului și ar funcționa ca *proteine de construcție sau de eșafodaj* („scaffolding proteins").



			Număr copii/virioni
II	II	II, 135K	640
IIa	IIa	IIa, 120K	?
III	III	III, 88K	100
IIIa	IIIa	IIIa, 74K	?
IV	IV	IV, 62K	50-100
	?	IVa, 55K	?
	?	V, 52K	180
Va, Vb	Va, Vb	VII, 19K	1070
		VI, 22K	420
VIa, VIb	VIa VIb	VIII, 14K	400
?	?	IX, 12K	
?	?	X, 7,5K	?
VIIIb_13K	VIIIa_13.5K		

Fig. 50. — Asamblarea virionilor de *Adenovirus*. Schema prezintă fazele procesului de asamblare, cu menționarea sub fiecare structură intermediară a polipeptidelor prezente, iar în ultimele coloane greutatea moleculară a fiecărui polipeptid și numărul de molecule prezente în virionul matur (după Casjens și King, 1971).

Genomul viral pătrunde în precapsidă printr-un mecanism necunoscut încă, fie singur, fie asociat cu proteinele interne („core—proteins") pV și pVII.

Eficiența procesului de asamblare este relativ mică. La sfîrșitul replicării celulele-gazdă conțin cantități mari de genomuri virale și proteine structurale asociate cu virioni maturi, capside goale, previrioni și virioni defectivi (al căror ADN este lipsit de o regiune ± întinsă a genomului).

Faza de asamblare a adenovirusurilor are loc în nucleu și durata ei este cuprinsă între 13 și 30 de ore după infecție. La sfîrșitul ei, fiecare celulă infectată care este distrusă prin necroză eliberează între 10^5 și 10^6 virioni (van der Werf și Girard, 1980).

Replicarea adenovirusurilor este un proces care necesită prezența în mediu a argininei. În lipsa ei, componenții virionului sînt sintetizați în cantități mici, împiedicînd îndeosebi faza tardivă a replicării și formarea unui factor de maturare, bogat în arginină, care ar putea fi un component al corpului central al virionului.

Replicarea virusurilor din grupul Herpes

Infectarea celulelor-gazdă cu *Herpes simplex virus* (HSV) se face fie din mediul extern, după o fază de recunoaștere a celulei, mediată de învelișul extern, bogat în lipide, al particulei virale, fie prin transfer direct, de la o celulă infectată la alta normală, fără trecere prin mediul exterior. Transferul intercelular este facilitat de modificările produse de infecție în membrana celulară.

Pătrunderea virusului exogen în celulă se face cel mai adesea prin pinocitoză, dar și prin fuziune. Prezența învelișului extern favorizează nu numai adsorbția virusului, ci și pătrunderea acestuia prin fuziune, deși existența lui nu este absolut necesară pentru infecțiozitate. După îndepărtarea învelișului extern, în citoplasmă, nucleocapsida migrează rapid în nucleul celulei.

Sub influența unor proteine virale precoce se produce o alterare a funcțiilor celulare, însoțită de modificări morfologice și biochimice profunde (marginarea cromatinei din nucleu însoțită de modificări ale membranei nucleare, inhibarea sintezei proteinelor celulare ca rezultat al dispersării poliribosomilor citoplasmatici formați de ARNm celular, ruperea cromosomilor, inhibarea sintezei ARN și ADN etc.). Paralel cu aceasta, celula este transformată într-o „fabrică" de virus, în care se formează poliribosomii specifici ARNm viral. Sinteza proteinelor virale are loc în citoplasma celulei, după care acestea sînt transportate în nucleu unde are loc replicarea ADN și morfogeneza virusurilor.

Între proteinele virale „precoce", pe lîngă cele cu rol în replicarea genomului viral și în alterarea metabolismului celulei-gazdă, se găsesc și proteine structurale de capsidă, fenomen excepțional în cazul dezoxivirusurilor.

Sinteza ARNm viral prin transcrierea ADN genomic are loc în nucleul celulei infectate și se face sub forma unui număr mic de molecule foarte lungi, care ulterior sînt clivate de enzimele celulare sau virale pentru a forma molecule cu o lungime corespunzătoare secvențelor care codifică un singur polipeptid viral (Wagner, 1974). Trecerea ARNm viral din nucleu în citoplasmă se face printr-un mecanism identic celui care asigură transportul ARNm în celula normală neinfectată.

Replicarea ADN începe după 2—4 ore de la infecție și durează în medie două ore, după care este blocată de intervenția unei proteine virale specifice. Dinamica sintezei de ADN viral poate fi urmărită datorită conținutului său bogat în G + C, care permite separarea de ADN celular.

Dealtfel, replicarea ADN de HSV este realizată de o ADN-polimerază virală (proteină precoce) care sintetizează preferenţial ADN cu conţinut G + C ridicat (în cazul HSV ~67 %).

Sinteza proteinelor „tardive". Aproximativ 35—40 % din informaţia genetică totală a HSV se exprimă sub formă de funcţii precoce, iar restul de ~60 % sub formă de informaţie „tardivă" (Wagner, 1974). Cu toate acestea, Hay (1971), presupunînd că fiecare genă pentru o proteină structurală a HVS este prezentă numai într-un singur exemplar în genomul viral, apreciază, pe baza sumei greutăţilor moleculare ale proteinelor structurale cunoscute, că numai 12—15 % din ADN viral este suficient pentru a codifica toate proteinele structurale. În felul acesta, genomul HSV ar purta o cantitate mare de informaţie adiţională care ar fi utilizată pentru sinteza unor proteine nestructurale de tipul enzimelor timidinkinaza, dezoxicitidinkinaza, DNaza, dezaminaza etc.

Proteinele „tardive" includ constituenţii majori şi minori ai virionului, proteinele învelişului extern şi pe cele implicate în morfogeneză, precum şi unele enzime implicate în răspîndirea virusului la alte celule noi. Paralel cu sinteza lor, continuă transcrierea de ARNm de la genele „precoce" astfel că informaţia din genomul HSV este exprimată plenar după replicarea ADN. Datorită acestei particularităţi, în perioada tardivă a infecţiei, ARNm precoce predomină cantitativ în celula-gazdă

În ansamblu, rata globală a sintezei proteinelor în celulele infectate cu HSV scade în primele ore după infecţie, datorită inhibării sintezei proteinelor celulare. Urmează o perioadă de stimulare datorită sintezei de proteine virale care începe după ~2 ore şi ajunge rata maximă după ~8 ore. Replicarea ADN se face după o curbă similară, la distanţă de aproximativ o oră. În celulele infectate cu HSV apar peste 20 tipuri de polipeptide noi. În cele din urmă, activităţile biosintetice ale celulei încetează şi aceasta se transformă într-un „sac" cu constituenţii virusului progen. Ca urmare a alterărilor de metabolism induse de virus, celulele infectate prezintă modificări ale membranelor nucleare şi plasmatice. În funcţie de tulpina de virus ele au aspectul rotunjit sau de policariocit sau aspecte intermediare între aceste extreme (fig. 51).

Asamblarea HSV are loc în nucleu. Proteinele structurale ale virionului încapsidează ADN viral nou sintetizat, după care particulele virale „înmuguresc" prin membrana nucleară alterată (cu aspect foarte ordonat), formîndu-şi învelişul extern. Procesul are loc cu o eficienţă foarte mică, deoarece numai 15 % din genomurile progene sînt încorporate în virioni.

Virusul închis într-o cisternă perinucleară, în care este protejat de acţiunea enzimelor care l-ar putea „dezveli", înaintează prin citoplasmă spre exteriorul celulei pe calea canaliculelor formate în celulă după infecţie. Celulele infectate cu HSV îşi menţin integritatea fizică şi anumite activităţi mult timp, păstrînd virusul replicat intracelular.

În cazul în care se formează sincron şi rapid mari cantităţi de particule virale, acestea pot fi evidenţiate sub forma unor cristale virale intranucleare (Epstein, 1965). Frecvent, nucleul celular conţine mari cantităţi de material fin granular (⌀ ~10 nm) care ar putea reprezenta depozite de proteine capsomerice.

În stadiile tardive ale infecţiei, nucleii se pot liza, eliberînd în citoplasmă particule virale „nude". În acest caz, formarea învelişului viral

poate fi asigurată în cursul înmuguririi prin membrana plasmatică a celulei, modificată în urma infecției virale.

Frecvent, celulele infectate cu virus fuzionează cu o celulă normală și întreg ciclul de replicare este reluat în aceeași succesiune (Sherwood, 1975).

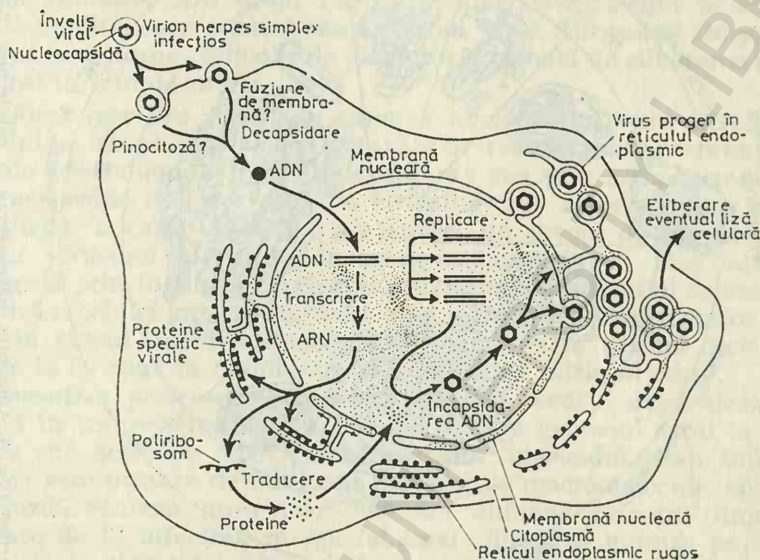


Fig. 51. — Reprezentarea schematică a etapelor ciclului de replicare a virusului *Herpes simplex* într-o celulă umană.

Replicarea HSV este dependentă de prezența argininei în mediu. În culturile celulare lipsite de arginină sinteza de ADN și proteine continuă, cu excepția proteinelor bogate în arginină din corpul central al virionului care sînt formate în cantități foarte mici, ceea ce împiedică maturarea virusurilor. În plus, în celulele lipsite de arginină, transportul proteinelor capsidale din citoplasmă în nucleu este blocat, fapt care împiedică, de asemenea, asamblarea virusului progen.

Replicarea HSV este un proces relativ complicat datorită traficului intracelular al diferiților constituenți ai virionului (ADN viral trece din citoplasmă în nucleu; ARNm din nucleu în citoplasmă, la ribosomi; proteinele structurale din citoplasmă în nucleu; asamblarea nucleocapsidei are loc în nucleu, după care virionul nud trece în citoplasmă prin membrana nucleară modificată).

Replicarea virusurilor din grupul Pox

Joklik și McAuslan (1969) au descris următoarea succesiune a fazelor procesului de replicare pentru virusul vaccinei (fig. 52):

După o fază de *adsorbție* nespecifică (fără participarea unor receptori celular), virusul înglobat de regulă prin pinocitoză (viropexie) ajunge intact în citoplasmă, în interiorul unei vacuole fagocitare.

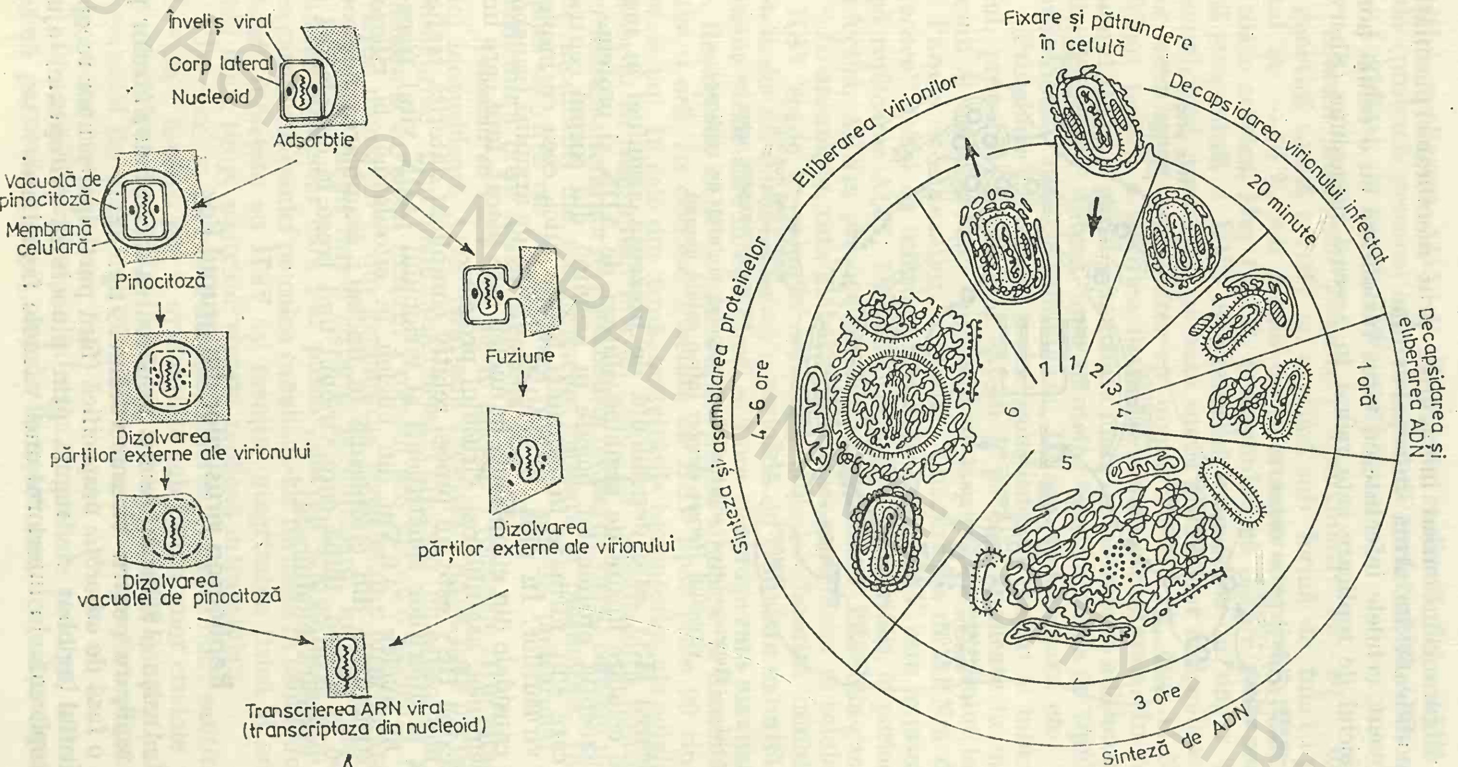


Fig. 52. — Reprezentarea schematică a fazelor ciclului de replicare a virusurilor *Pox*. A. Adsorbția, pătrunderea în celule prin pinocitoză și/sau fuziune și decapsidarea. B. Etapele succesive (1—7) ale procesului de biosinteză a constituenților virali și morfogeneza virionilor (după Dales, 1963).

Decapsidarea este un proces complex care s-ar realiza în două faze succesive :

a) *Faza nespecifică* se petrece în interiorul vacuolei fagocitare și constă în degradarea învelișurilor externe ale virionului sub acțiunea enzimelor celulare. Are drept rezultat conversia virusului la structura subvirală numită corp central sau nucleoid viral. În același timp, are loc dizolvarea membranei vacuolei de pinocitoză, urmată de eliberarea nucleoidului viral în citoplasmă.

Faza specifică constă în ruperea nucleoidului viral și eliberarea genomului în citoplasmă. Această fază s-ar realiza prin intervenția unei enzime de proveniență virală *(decapsidaza)* sau prin sinteza unui sistem enzimatic specific de „dezvelire" a virusului, sub acțiunea unor gene ale celulei-gazdă normal inactive, care suferă un proces de derepresie, sub influența virusului infectant. În unele cazuri, virusul *Pox* pătrunde în celula-gazdă prin fuziunea învelișurilor externe ale virionului cu membrana plasmatică a celulei-gazdă. În acest caz, dizolvarea învelișurilor virale are loc în cursul traversării membranei celulare, în așa fel încît virusul apare de la început în citoplasmă sub formă de nucleoid viral.

Biosinteza proteinelor „precoce" are loc imediat după decapsidare și constă în transcrierea a circa 40—50 % din genomul viral la ARNm timpuriu sub acțiunea ARN-polimerazei din nucleoidul viral. Infecția cu virus *Pox* este urmată de inhibarea sintezei de macromolecule aparținînd celulei-gazdă. Sinteza proteinelor celulare diminuă prompt (după circa 10 minute de la infecție), în așa fel încît după 45 minute peste 50 % din proteinele sintetizate sînt virale, iar după 1—2 ore se sintetizează numai proteine virale. Suprimarea sintezei proteinelor celulare are loc printr-un proces de întrerupere („shut-off") reprezentat de dispariția poliribosomilor legați de ARNm celular și înlocuirea lor cu poliribosomi legați de ARNm viral. Sinteza ADN și ARN celular este oprită tardiv (după 5—6 ore).

Virusurile *Pox* conțin în structura virionului nu numai transcriptaza virală necesară penru formarea ARNm, ci și toate enzimele utilizate pentru modificarea ARNm (metilare, guanilare, adăugarea secvenței „cap" etc.), ca și pentru extruzia ARNm din nucleoizi cu ajutorul energiei furnizată de hidroliza ATP. Diferitele enzime sînt prezente în proporție de ~100 molecule/virion. Ele sînt deci sisteme de transcriere integral autonome.

Dintre proteinele timpurii, al căror număr este > 50, numai cîteva sînt cunoscute ca funcție și anume : a) proteine enzimatice (timidinkinaze, ADN-polimeraze, mai multe nucleaze) ; b) proteine de reglare care blochează replicarea ADN din celula-gazdă, precum și sinteza de ARN și de proteine celulare ; c) cîteva proteine structurale de virion ca excepție de la regula generală și d) proteine care formează matricea incluziunilor, delimitînd „fabricile" de virus în care au loc replicarea genomului și încorporarea în virionii proprii. Incluziunile produse de aceste proteine sînt foarte caracteristice și ușor de evidențiat la microscopul optic. Ele sînt alcătuite din material fibrilar și sînt localizate în diferite părți din citoplasmă. Numărul lor în celulă este proporțional cu multiplicitatea infecției, ceea ce sugerează că fiecare virion infecțios inițiază propria sa „fabrică" de virus.

După 1,5–2 ore de la debutul infecţiei ritmul de transcriere a genelor precoce este încetinit, deoarece începe replicarea genomului şi exprimarea genelor tardive.

Replicarea genomului viral are loc în zone delimitate din citoplasmă, adevărate „fabrici" de virus şi este complet terminată după circa 3–6 ore (înainte de apariţia virusului neoformat). În toate cazurile, ADN viral este sintetizat în exces ($\sim$20 000 molecule/celulă) şi acumulat într-un depozit de genomuri individuale din care mai puţin de 25 % vor fi preluate la întîmplare şi incluse în virioni.

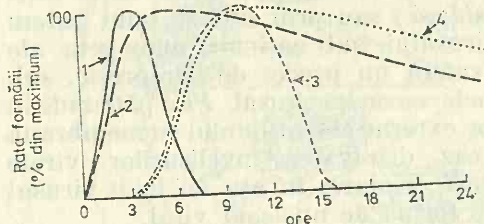


Fig. 53. — Dinamica sintezei proteinelor specifice virale ale virusurilor *Pox* (*Vaccina*). **1.** Proteine precoce (enzime precoce şi două proteine structurale) a căror sinteză este blocată cînd începe replicarea ADN. **2.** Proteine precoce a căror sinteză continuă tot ciclul de replicare. **3.** Proteine tardive sintetizate puţin timp după replicarea ADN, a căror sinteză este apoi stopată. **4.** Proteine tardive (constituenţi structurali ai virionului) formate în tot cursul perioadei tardive a replicării (după Joklik, 1967).

Potenţialul de codificare al genomului *Pox* este de aproximativ 160 de proteine cu g.m. 50 000 dal, ceea ce depăşeşte cu mult numărul proteinelor structurale cunoscute. Este posibil ca o bună parte din informaţie să fie folosită pentru sinteza unor sisteme enzimatice implicate în replicarea genomului, morfogeneză etc.

Biosinteza proteinelor „tardive". Genomurile virale progene servesc ca model pentru formarea unui ARNm-tardiv care codifică în special subunităţile structurale care vor alcătui capsida (fig. 53).

Proteinele tardive cuprind $\sim$30 de proteine structurale, dintre care 17 sînt localizate în „corpul central" viral, 5 pe suprafaţa virionului şi unele proteine enzimatice încorporate în virion (ARN-polimeraza, două dezoxiribonucleaze ş.a.); cele mai multe sînt proteinele structurale de capsidă. Deoarece polipeptidele structurale nu se formează în celulele infectate în aceeaşi proporţie în care apar în virion, unele polipeptide cu g.m. mică se agregă în structuri cu g.m. mare, foarte curînd după ce s-au format.

Fenomenul de „întrerupere" („switch-off phenomenon"). Iniţierea fazei tardive a ciclului de multiplicare a virusului vaccinal are drept rezultat blocarea sintezei *unora* dintre proteinele timpurii şi în special a enzimelor timpurii. Fenomenul are loc, deşi ARNm precoce are o mare stabilitate şi, în plus, el continuă să se formeze în mod constant (fig. 54).

Fenomenul de „întrerupere" este datorat, în esenţă, apariţiei unei incapacităţi bruşte a ARNm-precoce de a funcţiona în procesul de biosinteză a proteinelor şi reprezintă un mecanism de reglare a expresiei genelor la nivelul traducerii informaţiei genetice, care permite blocarea selectivă a exprimării unor gene precoce în cursul fazei tardive. În cazurile în care se blochează cu inhibitori sinteza de ADN şi proteine, fenomenul de întrerupere nu mai apare. Această comportare sugerează că una din proteinele tardive sintetizate împiedică în mod specific traducerea ARNm care codifică proteinele enzimatice timpurii. Mecanismul inhibitor este

foarte specific, deoarece alte proteine timpurii (de ex., cele structurale) continuă să se formeze. Fenomenul de întrerupere intervine și în controlul sintezei unor proteine tardive, care sînt formate numai o perioadă limitată de timp (cîteva ore după ce replicarea ADN ajunge la maximum).

Morfogeneza. Sinteza și asamblarea virionilor *Pox* au loc într-o zonă din citoplasmă care formează „fabrica" de virus *(viroplasma)*, unde virusul se acumulează înainte de a fi eliberat. Viroplasma apare după

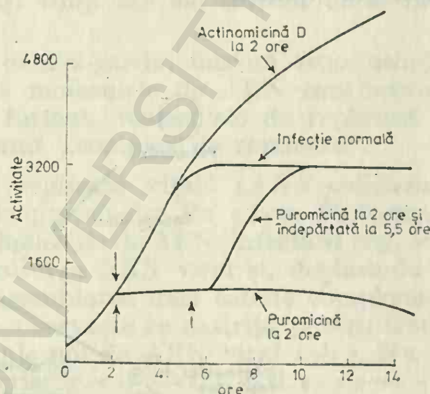


Fig. 54. — Mecanismul molecular al fenomenului de „întrerupere". Sinteza enzimelor precoce (timidinkinaza, ADN-polimeraza) începe curînd după infecția cu virusul vaccinal și este întreruptă normal după 4—5 ore. Dacă după 2 ore de la infecție se adaugă actinomicină D (care inhibă formarea ARNm), fenomenul nu apare, ceea ce demonstrează că ARNm al enzimelor precoce este foarte stabil și că întreruperea este condiționată de formarea altui ARNm. Dacă se adaugă puromicină la 2 ore de la infecție formarea enzimelor precoce încetează imediat; dacă puromicina se îndepărtează după 5,5 ore sinteza enzimelor se reia, apoi este întreruptă după un interval de timp, echivalent cu cel dintre adăugarea puromicinei și începutul „întreruperii' normale, ceea ce demonstrează că fenomenul de întrerupere este condiționat de acumularea unei anumite cantități a unei proteine specifice (McAuslan, modificat de Joklik, 1976).

2—3 ore de la infecție, ca un teritoriu celular care conține granulații dense și filamente fine, orientate la întîmplare, care parcă împing în părți mitocondriile și alte organite.

Inițial se formează particule virale imature, care dau naștere unor particule mature, mai complexe structural, cu corpi laterali și membrană dublă la exterior. Timpul necesar pentru asamblarea unei particule virale complete în jurul ADN este de ~1 oră.

Morfogeneza virusului durează pînă la 16—25 de ore de la debutul infecției, cînd 1/3—1/2 din genomurile virale progene sînt închise în particule mature de virus, iar celula conține circa 10 000 virioni dispersați în diferite regiuni ale citoplasmei.

Replicarea virusurilor cu genom ARN

Replicarea virusurilor cu genom ARN constituie o problemă unică în biologie, deoarece oferă singurul exemplu în care informația genetică este codificată originar nu în ADN — depozitarul universal de informație genetică — ci într-o moleculă de ARN înzestrată, ca și cea de ADN, cu capacitate de replicare. În cursul infecției unei celule-gazdă, ARN viral îndeplinește o dublă funcție: a) acționează direct în procesul de biosinteză a proteinelor ca transportor al mesajului genetic, furnizînd

informaţia necesară pentru sinteza proteinelor structurale ale capsidei şi a replicazei virale; b) acţionează ca model pentru sinteza a noi molecule de ARN sub acţiunea acestei polimeraze.

Replicarea picornavirusurilor

(Pl. 15)

Cele mai multe date privind mecanismul replicării picornavirusurilor se referă la *Poliovirus*, datorită importanţei deosebite a acestuia pentru patologia umană.

Fig. 55. — Reprezentarea schematică a ciclului de replicare a poliovirusurilor ***(Picornavirus)*** **(după Burke şi Russel, 1975).**

Pătrunderea picornavirusurilor în celulă şi eliberarea ARN (decapsidarea) sînt precedate de o fază de adsorbţie selectivă, realizată de atracţia specifică a unor receptori celulari pentru proteinele capsidale. Interacţiunea *Poliovirus* — receptori celulari s-ar face prin intermediul proteinei VP4, care se desprinde de pe suprafaţa virionului, determinînd o modificare profundă în arhitectura capsidei. Virionul implicat pătrunde prin pinocitoză în citoplasmă unde procesul de decapsidare continuă, facilitînd astfel eliberarea genomului ARN (fig. 55).

Genomul este reprezentat de o moleculă de ARN m.c. linear cu g.m. $2{,}6 \times 10^6$ dal a cărui secvenţă, integral cunoscută (Wimmer, 1980), poate codifica $\sim$2 500 AA. El are la extremitatea sa 5′ o moleculă de A (acid adenilic), urmată de 7 500 nucleotide, care codifică proteinele virale şi de două molecule de G (acid guanilic). Extremitatea 3′ este formată dintr-o secvenţă de 75 acizi adenilici *(extremitatea poli-A* sau

acid poliadenilic). Secvenţa terminală poli-A are rolul de a stabiliza într-un mod încă necunoscut ARN pe ribosomi, făcîndu-l să funcţioneze cu eficienţă maximă (Baltimore, 1975).

Genomul viral are structură de genom ARN « + » şi, ca urmare, funcţionează în acelaşi timp ca genom (ARNv) şi ca ARNm, deoarece informaţia sa poate fi tradusă la proteine direct, fără o etapă intermediară de transcriere (Baltimore, 1975).

În faza de eclipsă, care durează ~3 ore, genomul viral inhibă sinteza ARN şi a proteinelor celulare, eliberînd „maşinăria" de sinteză a celulei pentru a sintetiza proteinele virale, pe poliribosomii celulei, utilizînd ARN viral ca ARNm. În acelaşi timp are loc sinteza cu o rată crescîndă a ARN viral.

Procesul are loc în citoplasma celulei-gazdă, într-un situs asociat cu membranele celulare netede, unde moleculele de ARN care servesc ca model şi cele de ARN viral nou format, moleculele de replicază şi membrana formează un ansamblu numit „complex de replicare".

Replicarea este efectuată de o *replicază* virală (*ARN-polimeraza dependentă de ARN*), care corespunde proteinelor Px şi/sau P2,formate prin traducerea informaţiei din cîteva molecule de ARN infectant (fig. 56). Replicaza se leagă de extremitatea poli-A a ARN viral şi, deplasîndu-se de-a lungul catenei « + », determină asamblarea unei catene complementare « — ». Odată formată, catena « — » serveşte ca matriţă pentru transcrierea simultană a mai multor molecule noi de ARN viral « + ». Nu se ştie dacă aceeaşi replicază face transcrierile « + »→« — » şi « — »→« + » sau dacă funcţionează două replicaze (cîte una pentru fiecare sens).

Existenţa acestui mecanism de replicare a ARN viral a fost demonstrată de Baltimore şi Spector (1975), care au izolat o structură complexă, numită „intermediar de replicare" (ARN „IR"), formată din mai multe catene ARN « + » cu lungimi diferite, legate parţial de lan-

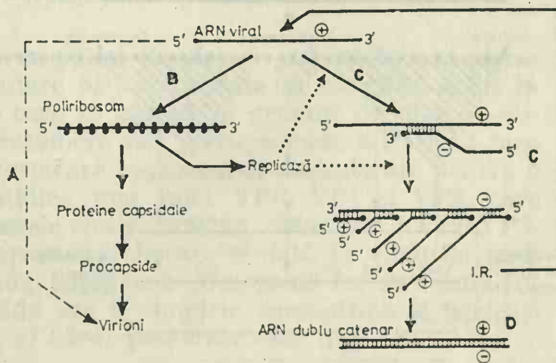


Fig. 56. — Rolul moleculelor de ARN prezente în celulele infectate cu *Poliovirus*. Moleculele de ARN viral « + » produse prin replicare sînt utilizate la întîmplare, fie ca genomuri prin încapsidare în virioni (A), fie ca ARNm pentru sinteza de noi proteine virale (B), fie ca matriţă pentru sinteza de molecule noi complementare ARNc « — », prin formarea de complexe de replicare (C). Intermediarii de replicare (I.R.) îşi termină activitatea ca ARN d.c., care se acumulează în celulă şi nu mai participă la replicare (D).

ţurile « — » pe care au fost sintetizate. Transcrierea catenelor « + » pe intermediarii de replicare durează scurt timp (circa 15 minute), deoarece, la un moment dat, o catenă «+ » nu se mai poate desprinde de lanţul său « — »: replicarea este blocată prin transformarea intermediarului repli-

cativ funcțional în ARN d.c., care este incapabil de replicare și se acumulează în celula infectată.

Datorită acestui mecanism de replicare celulele infectate cu picornavirusuri conțin 3 specii diferite de ARN: 1) ARN m.c. cu aceeași secvență cu ARNv « + » reprezentînd genomurile virale replicate; 2) ARN „IR", format dintr-o catenă «— » întreagă, care funcționează ca matriță, de care sînt legate 4—5 lanțuri inegale de ARN « + » pe cale de sinteză; 3) ARN d.c. cu catene « + » și « — » formate după ce ARN „IR" încetează să funcționeze.

Moleculele de ARN viral « + » nou sintetizat în celulă pot avea trei destinații diferite: a) pot fi folosite ca matriță pentru transcrierea de lanțuri « — », care la rîndul lor inițiază formarea unor noi complexe de replicare; b) pot fi folosite ca ARNm pentru traducerea la proteine și c) acționează ca genom progen, asociindu-se cu proteinele structurale pentru a forma virioni maturi. Nu se cunosc factorii care determină direcția de utilizare a unei molecule de ARN ca genom sau ca matriță. Este posibil ca acest proces să fie influențat de mediu și în special de modul în care ARN se leagă inițial de proteinele capsidale sau de ribosomi.

Replicarea și acumularea ARNv se fac exponențial în primele 3 ore de la infecție, care corespund fazei de eclipsă, după care creșterea devine lineară.

Traducerea informației genetice. Deoarece ARN viral are în structura sa numai două semne de punctuație (unul „start" și altul „stop") el acționează ca un ARNm monocistronic. Ribosomii legați inițial de capătul său 5′ se deplasează de-a lungul întregii molecule de ARN, determinînd sinteza unui lanț polipeptidic gigant, cu g.m. 250 000 dal, poliproteina primară „*POO*".Sinteza, respectiv traducerea întregii secvențe a informației din ARNv la nivelul ribosomilor durează ~ 5 minute. Această

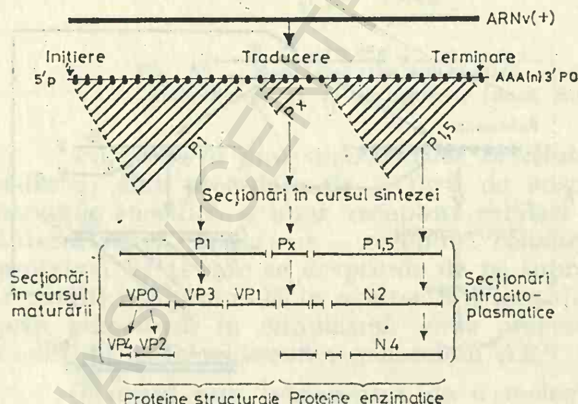


Fig. 57. — Sinteza proteinelor în cursul replicării poliovirusurilor. ARN viral este tradus integral ca o poliproteină POO (g.m. 250 000), care este scindată în cursul sintezei în alte 3 poliproteine: P1 (g.m. 125 000), precursorul proteinelor capsidale VP0 (scindată ulterior la VP4 și VP2), VP3 și VP1; Px (g.m. 35 000) și P1,5 (g.m. 90 000) sînt și ele clivate în citoplasmă, în proteine nestructurale (N2, N4), probabil cu rol în replicarea ARN sau în inhibarea sintezelor celulare (după Girard și Hirth, 1980).

proteină imensă este clivată foarte repede (chiar în cursul sintezei) de către endopeptidazele celulare la nivelul a două situsuri specifice, ceea ce are ca rezultat formarea a 3 proteine mai mici, notate P1

(g.m. 125 000 dal), Px (g.m. 35 000 dal) și P1,5*) (g.m. 90 000 dal). Procesul de clivare proteolitică continuă după ce aceste proteine s-au desprins de pe poliribosomi cu ajutorul unor proteaze virale (fig. 57).

Proteina P1 — care este o poliproteină precursor a proteinelor capsidale—este scindată în 3 proteine mai mici VP0, VP1, VP3, iar proteina VP0, la rîndul său, este scindată în faza de maturare a virionului în alte două proteine VP2 și VP4.

În mod similar, *proteinele Px și P1,5* sînt scindate pentru a forma mai multe proteine cu funcții enzimatice, implicate în replicarea ARN viral sau în inhibarea sintezelor celulare.

Morfogeneza virionilor. Capsida picornavirusurilor se formează într-o serie de etape succesive în cursul cărora proteinele sînt clivate și agregate în structuri diferite, numite precapsomere → capsomere → precapsidă → provirion → virion.

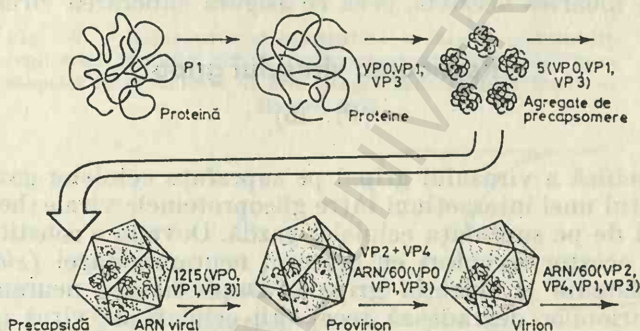


Fig. 58. — Etapele intermediare ale morfogenezei virusului *Polio* și moleculele care participă la formarea precapsomerelor, a precapsidei, a provirionului și a virionului.

Procesul de asamblare are ca punct de plecare subunitățile poliproteice P1 (constanta de sedimentare 5S) acumulate în cantități mari în celula infectată cu virus polio, care se agregă în grupuri de cîte 5 subunități (14S) pentru a forma pentamere sau precapsomere 5(P1). În faza următoare, proteinele P1 care formează capsomerele sînt clivate pentru a produce trei molecule polipeptidice mai mici VP0, VP1 și VP3, care rămîn asociate formînd capsomerele virale, care au structura 5(VP0,VP3, VP1). Prin asamblarea a 12 capsomere, fiecare situată la vîrfurile unui icozaedru, se formează o capsidă goală sau *precapsidă* cu structura 12 [5 (VP0, VP3, VP1)]. Precapsida are o simetrie icozaedrică și aceleași dimensiuni ca și virusul matur, al cărui precursor este (fig. 58).

---

*) Clivarea proteinelor virale după formarea lor este întîlnită și la alte virusuri (*Vaccina*, *Reo-*, *Myxo-*, *Togavirus* etc.) la care unele proteine sînt sintetizate sub forma unor precursori mari. Explicația acestui fenomen nu este încă cunoscută. Precursorii ar reprezenta forme în care proteinele capsidale trebuie să se găsească înainte de asamblare, pentru a prezenta configurația necesară interacțiunii corecte cu alte proteine. Clivarea precursorilor în proteine capsidale mai mici ar putea reprezenta forța motrice a morfogenezei.

În etapa următoare, genomul viral (ARNv) pătrunde în capsidă printr-un mecanism încă necunoscut, dînd naştere unei particule virale fragile, neconsolidată şi, ca urmare, uşor de disociat, numită *provirion* (125S), care are structura ARN [60(VP0, VP1, VP3)].

În ultima fază, provirionul se transformă în virion (particulă virală matură infecţioasă) prin clivarea lanţului polipeptidic VP0 în VP2+VP4. Virionul matur are formula de structură ARN [60(VP2, VP4, VP1, VP3)] şi 150S. Procesul de asamblare a virionului polio durează ~20 minute.

Durata ciclului de replicare este variabilă, în funcţie de tulpina de virus, de natura celulei-gazdă şi de starea ei fiziologică. În celulele HeLa, virusul progen apare după 3 ore de la infectare şi poate să depăşească numărul de 100 000 virioni per celulă. Adeseori, poliovirusul progen se poate acumula în citoplasma celulelor în şiruri mari paracristaline. Picornavirusurile animale sînt în general marcat citopatogene. Multiplicarea lor se însoţeşte de oprirea sintezei de macromolecule specifice celulei-gazdă şi de moartea acesteia, ceea ce asigură eliberarea virusului progen.

Replicarea virusului gripal

(Pl. 16)

Fixarea specifică a virusului gripal pe suprafaţa celulelor-gazdă receptive este rezultatul unei interacţiuni între glicoproteinele virale (hemaglutinine) şi receptorii de pe suprafaţa celulelor-gazdă. Dovada o constituie faptul că distrugerea acestor receptori cu ajutorul neuraminidazei *(sialidaza)* face celulele rezistente la infecţia gripală. După fixare, neuraminidaza din structura virionilor degradează receptorii celulari de virus (glicoproteine cu acid N-acetilneuraminic — acid sialic — ca zahăr terminal în lanţurile laterale de carbohidraţi), facilitînd astfel infecţia celulei.

Pătrunderea virusului în celulă se face prin viropexie (înglobare activă) şi/sau fuzionarea învelişului viral cu membrana plasmatică şi eliberarea nucleoplasmei direct în citoplasmă (Morgan). În cazul înglobării prin viropexie, virionii fagocitaţi sînt degradaţi parţial de enzimele lizozomale.

Replicarea genomului viral are cîteva particularităţi deosebite faţă de alte virusuri ARN. Deoarece genomul gripal are o polaritate negativă, el trebuie transcris la ARNm funcţional înainte ca replicarea să poată începe. În al doilea rînd, deoarece genomul este segmentat şi monocatenar, replicarea separată a celor 8 segmente de ARN viral pune probleme neobişnuite în asamblarea particulelor virale progene. În sfîrşit, multe date experimentale pledează pentru participarea, într-un mod încă nelămurit, a ADN din celula-gazdă la replicarea virusului gripal (Barry şi Mahy, 1979).

Transcrierea informaţiei precoce la ARNm (ARNc) începe la 15 minute de la infecţie, de cele mai multe ori înainte ca genomul să fie eliberat din învelişul proteic al nucleoidului viral (fig. 59).

Replicarea genomului se face în ritm rapid, în aşa fel încît după 3 ore de la infecţie 80% din ARN nou sintetizat în celulă este ARN viral.

Proteinele structurale sînt sintetizate pe poliribosomii citoplasmatici, după care migrează rapid în nucleu unde se acumulează. Hemaglutininele se sintetizează la nivelul reticulului endoplasmatic neted (fig. 60).

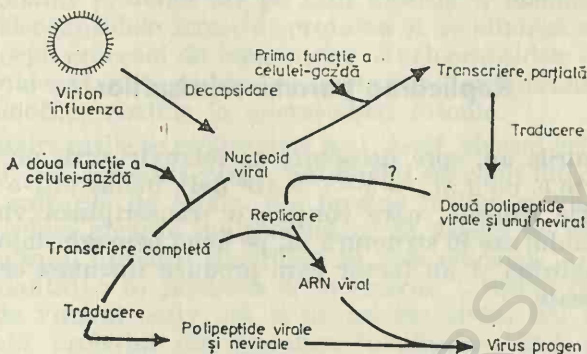


Fig. 59. — Reprezentarea schematică a fazelor ciclului de replicare a virusului gripal *(Orthomyxovirus)*, fără delimitarea etapelor intranucleare de cele citoplasmatice (după Burke şi Russel, 1975).

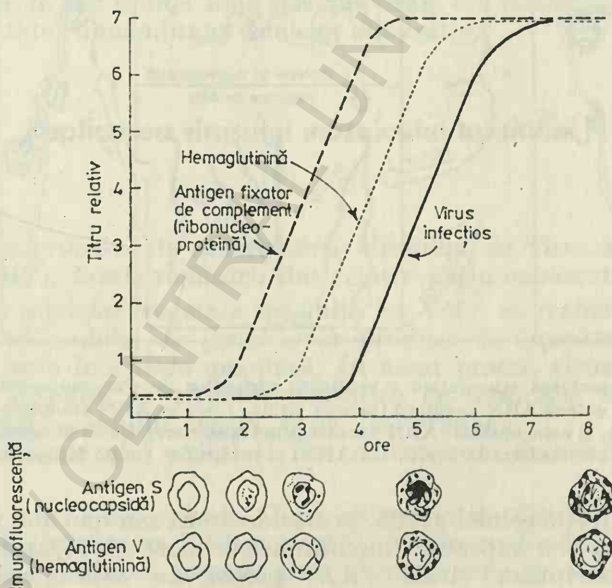


Fig. 60. — Reprezentarea diagramatică a etapelor de biosinteză a subunităţilor virale şi virionilor de *Orthomyxovirus*, apreciate prin titrarea virusului şi tehnica de imunofluorescenţă, cu antigenele de nucleocapsidă şi hemaglutinine (după Davis, 1969).

Morfogeneza coincide cu eliberarea primilor virioni din celulă prin înmugurire: nucleocapsida ribonucleoproteinică, după ce se asociază cu hemaglutininele şi cu neuraminidazele, care iau forma unor proiecţii

vizibile la microscopul electronic, vine în contact cu unele zone ale membranei plasmatice cu morfologie alterată de infecţia virală, la nivelul cărora virionii „înmuguresc" şi sînt eliberaţi din celulă, acoperiţi de un înveliş extern derivat din membrana acesteia.

Replicarea paramixovirusurilor

Paramixovirusurile au, spre deosebire de mixovirusuri, un genom nesegmentat (ARN m.c. cu g.m. $\sim 5-7 \times 10^6$ dal), inclus într-o capsidă tubulară cu simetrie helicală, care conţine o transcriptază virală. Învelişul extern al virionului are în structura sa, pe lîngă hemaglutinine şi neuraminidază, o hemolizină şi un factor care produce fuziunea celulelor în sinciţii multinucleate.

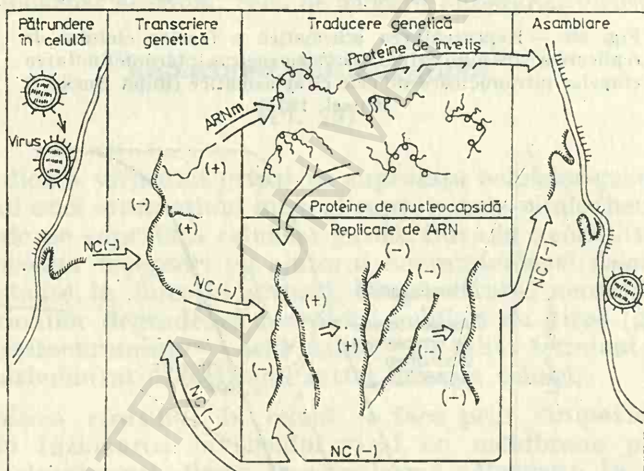


Fig. 61. — Reprezentarea schematică a replicării virionilor de *Paramyxovirus*. NC = nucleocapsidă ; « — » = catenă ARN negativă (genom viral) ; « + » = ARN complementar genomului viral, fie mai mic şi neîncapsidat (ARN format prin transcriere), fie cu dimensiunea genomului (matriţă intermediară în replicarea ARN) şi încapsidat (după Kingsbury, 1978).

După infecţia celulei-gazdă, prin endocitoză sau mai ales prin fuziunea învelişului viral cu suprafaţa membranei celulare şi decapsidare în citoplasmă, transcriptaza virală *(ARN-polimeraza dependentă de ARN)* sintetizează ARNm complementar, utilizînd ca matriţă genomul viral. Traducerea informaţiei genetice are ca rezultat sinteza celor 5—7 polipeptide virale prezente în structura virionului, care se acumulează în citoplasmă. Dintre acestea, două sînt glicoproteine şi conţin glucozamină, galactoză, manoză şi fucoză.

Replicarea genomului viral este asigurată de proteinele virale care folosesc ca matriţă genomul infectant. Nu a fost încă identificată forma intermediară de replicare (fig. 61).

Asamblarea virusului progen este însoțită de modificări importante în celulă, reprezentate de încorporarea glicoproteinelor care au luat forma caracteristică de spicule în membrana celulară și apariția unui strat electronodens (probabil proteina M) pe fața internă a membranei. În faza următoare, nucleocapsidele atrase de proteina M se aliniază sub membrana îngroșată și începe procesul de înmugurire. Nucleocapsidele de *Paramyxovirus* se acumulează sub forma de incluziuni citoplasmatice enorme, neregulate, acidofile, vizibile la microscopul fotonic.

Paramixovirusurile se replică mai lent decît virusul gripal și nu perturbă grav activitățile celulei-gazdă, producînd frecvent infecții temperate, persistente în culturile de celule. Ele produc fuziuni celulare urmate de apariția unor celule gigante multinucleate, cu aspect de policariocit sau sincițiu. Mecanismul formării sincițiilor nu este elucidat. Au fost incriminate două modalități: a) *fuziunea de la exterior* („fusion from without") produsă atît de virusul activ, cît și de cel inactivat, sau de hemolizina virală, rezultată probabil din fuziunea învelișului viral cu membrana plasmatică a celulelor adiacente și b) *fuziunea din interior* („fusion from within") apare ca un efect caracteristic al infecțiilor cu *Paramyxovirus*, în culturi celulare și *in vivo*, cu intensități variabile după tulpina de virus și cea celulară. Ea ar fi consecința fuzionării învelișului virusului care înmugurește sau a unei zone specific virale din membrana plasmatică a celulei infectate cu membrana celulelor adiacente.

Replicarea virusului mozaicului tutunului

(Pl. 17)

În opoziție cu procesul de asamblare a virionilor de virus al mozaicului tutunului (VMT), fazele replicării sînt relativ puțin cunoscute și studiate.

Infecția celulelor vegetale sensibile cu VMT se realizează pe calea unei răniri vindecabile, de genul celor produse de înțepătura insectelor vectoare sau prin inoculare mecanică. În acest proces, virusul este pasiv, deoarece nu dispune de structuri specifice de adsorbție sau inoculare, cum este, spre exemplu, cazul unor bacteriofagi.

Nu se cunosc nici sediul și nici mecanismul decapsidării (Zaitlin, 1977).

Sinteza proteinelor precoce. După eliberarea sa din învelișul proteic, genomul viral servește ca ARNm pentru sinteza replicazei virale sau cel puțin a unei părți din ea, precum și a altor proteine precoce încă neidentificate.

Replicarea genomului viral implică inițial formarea de ARN complementar (ARNc) față de cel genomic (ARNv) și apariția unei forme replicative a genomului, catalizată de *replicaza virală (ARN-polimeraza dependentă de ARN)*.

Forma replicativă este o moleculă de ARN dublu catenar, în care una dintre catene corespunde ARNv « + », iar cealaltă ARNc « — ». Catena de ARNc « — » produsă în prima fază a replicării servește ca

matriță pentru producerea de ARN genomic « + », sub acțiunea aceleiași replicaze virale. Acest proces are loc pe calea „intermediarilor de replicare" (IR), molecule de ARN, care sînt parțial dublu catenare și parțial monocatenare (fig. 62). În etapa următoare are loc traducerea informației genetice tardive, cu producerea proteinelor de capsidă.

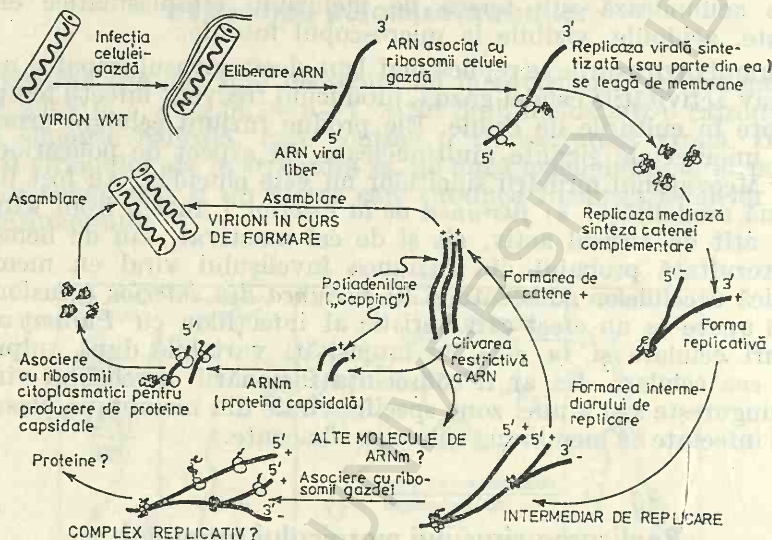


Fig. 62. — Ciclul de replicare al VMT (după Zaitlin, 1977).

Morfogeneza VMT. Fraenkel-Conrat și Williams (1955) au demonstrat că virionul de VMT disociat în componentele sale (lanțuri polipeptidice capsidale și ARN) cu ajutorul soluțiilor slab alcaline sau al detergenților este capabil de autoasamblare, reconstituind particula virală matură infecțioasă. Pe baza observațiilor de microscopie electronică au emis ipoteza că proteinele de capsidă „recunosc" ARN viral și se polimerizează în jurul lui, prin adăugarea secvențială a cîte unei molecule de proteină, după o simetrie helicală, pentru a forma un cilindru proteic, legat de genomul ARN, răsucit în interiorul acestuia.

Fraenkel-Conrat (1962) consideră că informația necesară pentru autoasamblarea capsidei VMT este prezentă în însăși structura subunităților proteice, care au o geometrie a suprafeței atît de precisă încît se pot ansambla simetric spontan într-un singur mod („subunități determinante de formă"). Dovada o constituie faptul că procesul de autoasamblare a proteinelor VMT se realizează și în absența ARN viral, rezultînd cilindri proteici practic identici cu virusul originar, dar neinfecțioși și cu lungimi diferite, în funcție de pH și de forța ionică. În prezența ARN viral, lungimea virionului este fixă (300 nm), fiind limitată de dimensiunile moleculei de ARN.

Procesul de asamblare are loc numai la temperatura camerei și la pH neutru, adică în condiții similare celor din planta-gazdă. Butler și

Klug (1978), studiind cu tehnici fizicochimice și electronomicroscopice modul de asamblare spontană a subunităților proteice din VMT (în absența ARN viral), au demonstrat că acest proces, controlat de pH și de forța ionică a mediului, este mult mai complex. Ei au demonstrat că la pH $> 8{,}02$ și forță ionică slabă, proteinele se găsesc sub forma unui amestec de monomeri și de mici agregate de subunități (di-, tri-, pentameri), constituind așa-numita „proteină A" (alcalină) (Schram și Zilig, 1955). La pH acid (6,0 sau inferior) proteinele se agregă pentru a forma structuri cilindrice cu simetrie helicală, analoge virionilor, dar lipsite de ARN. La pH 7,0—7,2 și forțe ionice mijlocii, proteinele capsidale se găsesc în special sub forma unor agregate stabile formate din două discuri adiacente (ca două monede suprapuse), fiecare disc fiind alcătuit din 17 proteine capsidale (fig. 63). Butler și Klug (1978) au demonstrat semnificația deosebită a discurilor duble în morfogeneza VMT și au reconstituit secvența specifică a procesului de asamblare.

Inițierea morfogenezei VMT și specificitatea asamblării ARN-proteine virale sînt condiționate de o interacțiune specifică care implică recunoașterea de către proteinele virale a unei anumite regiuni din molecula de ARN viral.

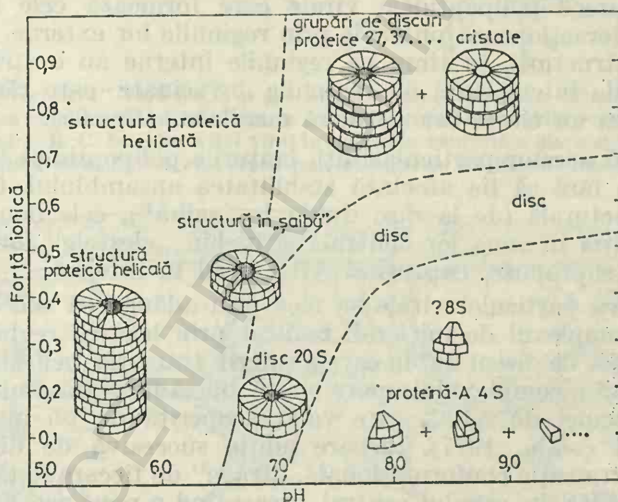


Fig. 63. — Diferitele grade de asamblare a subunităților proteice ale VMT în funcție de pH și forța ionică a mediului. Liniile întrerupte delimitează cele patru domenii corespunzătoare unor grade diferite de agregare a subunităților (după Durham și Klug, 1972).

Genomul VMT este format dintr-o moleculă de ARN m.c. cu g.m. 2×10^6 dal, alcătuit din 6 390 nucleotide, la a cărui extremitate 3′ OH Zimmern (1977) a identificat prezența unei regiuni lungă de ~ 65 nucleotide, care conține toată informația necesară pentru a specifica reacția normală de inițiere a asamblării, prin legarea ei puternică și specifică de un dublu disc proteic.

„Regiunea de inițiere" a ARN are o structură „în ac de păr" („hairpin structure"), cu o buclă de nucleotide, nelegate în perechi, la extremitatea superioară a porțiunii dublu helicale. Zona acestei anse are o secvență neobișnuită de nucleotide rezultată din repetarea bazelor G, A și U, în așa fel încît G apare de fiecare dată în poziția a 3-a (A**G**AA**G**) AA**G**UU**G**AU**G**). Această structură sugerează că asamblarea virionului ar fi inițiată cînd bucla regiunii de inițiere s-ar lega de un prim disc proteic (fiecare subunitate proteică avînd 3 situsuri de legare pentru nucleotide).

Legarea genomului viral („nuclearea" VMT). Asamblarea VMT este inițiată de inserția unei porțiuni din molecula de ARN viral, corespunzătoare „structurii de recunoaștere și inițiere", în canalul central al dublului disc proteic. După ce ARN pătruns în interiorul dublului disc se insinuează între unitățile acestuia, sub acțiunea unor factori necunoscuți, discul dublu suferă o tranziție conformațională care îi dă forma unei „șaibe Grover" („lockwasher"), adică o formă helicoidală (fig. 64).

Această transformare structurală efectuată sub acțiunea secvenței de recunoaștere a ARN asigură „integrarea" ARN în structura capsidei și transformarea helicală a discului dublu. Tranziția conformațională este posibilă deoarece polipeptidele virale care formează cele două discuri suprapuse interacționează puternic prin regiunile lor externe, care asigură stabilitatea structurii, în timp ce regiunile interne au o structură flexibilă, lipsită de interacțiuni cu regiunile învecinate care rămîn deschise spre centru ca un clește sau ca două maxilare (fig. 65).

Datorită acestor particularități, lanțurile polipeptidice își pot modifica replierea fără să fie afectată stabilitatea ansamblului. Cînd are loc tranziția structurală (de la disc dublu la „șaibă"), cele două discuri își modifică poziția în zona lor centrală și închid „cleștele" format de cele două discuri suprapuse, capturînd ARN viral în interior.

Alungirea particulei virale se face prin adăugarea succesivă de noi discuri la „complexul de inițiere" realizat prin legarea regiunii de recunoaștere a ARN de discul dublu care a suferit tranziția helicală. La suprafața superioară a complexului apare o altă buclă formată dintr-o porțiune nouă a moleculei de ARN, care va fi acoperită de un alt disc dublu (Lebeurier și colab., 1977). Fiecare adiție succesivă de discuri duble, urmată de o tranziție conformațională, „trage" de fiecare dată o parte din molecula de ARN în canalul central, prezentînd o nouă secvență de ARN la suprafața superioară a virionului, care crește prin adăugarea unui nou disc dublu. Astfel, pe măsură ce cantitatea de ARN din canalul central crește virionul se alungește.

Virusul incomplet constituit apare ca un cilindru cu două „cozi" inegale de ARN, la extremitatea opusă polului care crește: una din cozi, corespunzînd extremității 3'OH, are o lungime constantă, în timp ce cealaltă (extremitatea 5') are o lungime invers proporțională cu aceea a particulei pe cale de construcție. După ce extremitatea mai lungă a ARN este rapid acoperită de proteine, virusul începe să se alungească și la capătul său opus, corespunzător extremității mai scurte a ARN, pentru a forma o particulă virală completă.

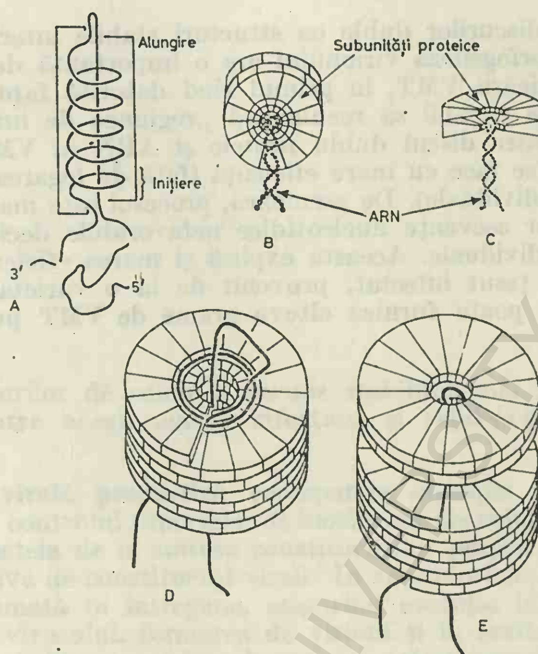


Fig. 64. — „Nuclearea" VMT (legarea genomului viral) și alungirea virionului. A. Structura în „ac de păr" cu regiunea de inițiere, care se leagă de primul disc dublu pentru a declanșa asamblarea virusului. B, C. Inserția ARN viral în scobitura centrală a discului dublu proteic. D, E. Alungirea virusului se realizează prin adăugarea de discuri duble de proteine.

A
Scobitura centrală
2 nanometri
Regiunea flexibilă
Situs de legare ARN
Legături necovalente
Lanț polipeptidic
Subunitate proteică
9 nanometri
Axul discurilor

B
C
D
E
Disc dublu proteic
3'
5'
ARN
Secvență de asamblare

Fig. 65. — Asamblarea VMT. A. Secțiune transversală printr-un disc dublu de proteine, evidențiind așezarea lanțurilor polipeptidice și structura de „clește" a regiunii centrale care va captura ARN viral. B-E. Reprezentarea schematică a fazelor de tranziție conformațională care determină simetria helicală a virionului și legarea genomului viral (după Butler și Klug, 1978).

Existenţa discurilor duble ca structuri stabile intermediare cu rol important în morfogeneza virionului are o importanţă deosebită pentru optimizarea replicării VMT, în primul rînd datorită faptului că numai discul dublu este capabil să recunoască „regiunea de iniţiere" a ARN. Recunoaşterea între discul dublu proteic şi ARN al VMT este instantanee şi legarea se face cu mare eficienţă (faţă de legarea de subunităţi sau de discuri individuale). De asemenea, procesul este mai puţin afectat de prezenţa unor secvenţe nucleotidice nefavorabile decît ar fi legarea de subunităţi individuale. Aceasta explică şi marea eficienţă a replicării VMT : 1 kg de ţesut infectat, provenit de la o varietate sensibilă de plante de tutun poate furniza cîteva grame de VMT purificat (Hirth, 1981).

Relaţiile dintre virusuri şi celula-gazdă

Utilizarea culturilor de celule a permis stabilirea mai multor tipuri de interacţiune între aceşti agenţi infecţioşi şi celulele-gazdă pe care le infectează.

Infecţia virală productivă corespunde situaţiei în care virusul infectant preia controlul proceselor de biosinteză ale celulei-gazdă, deviind activităţile acesteia de la sinteza constituenţilor proprii în sensul biosintezei ± exclusive de constituenţi virali. În aceste celule, informaţia genetică este exprimată în întregime, asigurînd evoluţia întregului ciclu de multiplicare a virusului, formarea de virioni şi în multe cazuri moartea şi liza celulei cu eliberarea virusului progen (efect citocid).

Celulele care permit exprimarea integrală a mesajului genetic, replicarea şi producerea de virus nou se numesc *celule permisive* şi datorează această proprietate structurii lor genetice. Celulele permisive provin de regulă de la speciile pe care virusul le infectează în mod normal în natură, deşi există şi excepţii (spre exemplu, celulele embrionilor de găină sînt permisive pentru *Orthomyxovirus* sau *Paramyxovirus*). Caracterul de permisiv sau nepermisiv este, cel puţin în unele cazuri, controlat genetic şi influenţat de gradul de diferenţiere celulară. Această ultimă particularitate este ilustrată de comportarea celulelor care formează verucile.

Celulele din zona centrală a verucilor sînt *nepermisive*, ele conţin genomul viral în stare de provirus şi sub influenţa acestuia se multiplică activ fără să producă virus. Datorită lor se produce creşterea verucilor. Pe măsură ce sînt împinse spre stratul extern al pielii, aceste celule evoluează spre starea de celule keratinizate, devin permisive, îngăduie exprimarea genomului viral şi, ca urmare, conţin cantităţi mari de virus progen. Aceasta demonstrează că diferenţierea celulară care determină keratinizarea induce (ca şi în cazul lizogeniei fagice) trecerea de la starea de provirus la starea de virus vegetativ, care asigură replicarea şi morfogeneza virală. Procesul evoluează ca şi cum diferenţierea ar suprima activitatea unor factori inhibitori ai funcţiilor virale prezenţi în celula nediferenţiată sau ar furniza prin însăşi procesul de diferenţiere factori noi care permit exprimarea genomului viral şi producerea de virus progen.

Infecţia abortivă corespunde situaţiei în care celula-gazdă nu permite multiplicarea virusului (celula nepermisivă) şi, ca urmare, acesta este eliminat. În celulele nepermisive informaţia genetică virală nu se poate exprima integral şi infecţia virală nu duce la formarea de virus progen.

În cazul virusurilor animale, celulele nepermisive provin de la animale care, în general, nu sînt gazde naturale pentru virusurile respective (spre exemplu, celulele de șoarece sau hamster pentru virusul simian SV40, celulele de hamster pentru virusul poliomului etc.).

În cazul celulelor bacteriene, după pătrunderea genomului fagic, evoluția acestuia (ca și a altor molecule de ADN străin) poate fi oprită datorită intervenției endonucleazelor de restricție (restrictaze), care acționînd ca un mecanism imunitar primitiv scindează și degradează moleculele de ADN exogen străin și asigură menținerea constantă a informației genetice normale (fig. 66).

Interacțiunea de tip integrativ a fost cel mai bine studiată în cazul infecției unei celule bacteriene cu un fag temperat. Infecția poate evolua fie în sensul trecerii fagului în stare vegetativă, urmată de sinteza a noi particule fagice și de liza celulei, fie în sensul menținerii lui în cadrul unei relații compatibile cu viața celulei. Virusul prezent în stare integrată în ADN-gazdă ca *profag* sau *provirus* (Lwoff, 1952) persistă nu numai în celula infectată, ci și în descendenții ei și își manifestă prezența prin exprimarea continuă a unora dintre genele virale a căror funcționare are, în principal, rolul de a menține starea integrată a genomului viral *(fenomenul de lizogenie)*.

Trecerea genomului viral din starea de profag în stare autonomă este urmată de inițierea ciclului de replicare virală *(infecție productivă)* care duce la liza și moartea celulei *(inducție litică)*.

Transformarea malignă reprezintă o varietate de interacțiune de tip integrativ caracteristică virusurilor oncogene. Integrarea determinanților genetici răspunzători de transformarea malignă în cromosomii celulelor animale sensibile este urmată de modificări profunde ale celulelor-gazdă care se exprimă prin apariția de tumori maligne solide sau leucemii.

Infecțiile persistente sînt infecții de lungă durată datorite unor virusuri care se multiplică în celule, în general fără a produce modificări profunde ale metabolismului celular. Cunoscute inițial numai la nivel de organism, au fost bine studiate odată cu intrarea culturilor de celule în practica generală de laborator. Sînt de 3 tipuri:

1) Infecțiile cronice echilibrate („steady state infections") corespund situației în care practic toate celulele dintr-o cultură sînt infectate cu un virus necitocid, care este produs continuu, uneori foarte intens, fără a fi necesară o infecție exogenă. Acest tip de infecție a fost evidențiat în cazul celulelor renale de maimuță, aparent normale, contaminate inaparent cu virusul SV40. În culturile de celule, virusul se multiplică normal și infectează practic toate celulele din cultură care, la rîndul lor, se multiplică, eliberînd uneori cantități mari de virus în mediu (pînă la 1 500 UFP/celulă/zi). În interacțiunea de tip echilibrat, virusul se replică fără a perturba profund metabolismul celulei-gazdă și fără efect citocid față de celulele pe care le infectează natural. Întrucît practic nu există o fază de infecție exogenă infecția de acest tip nu poate fi vindecată prin adăugarea de anticorpi neutralizanți.

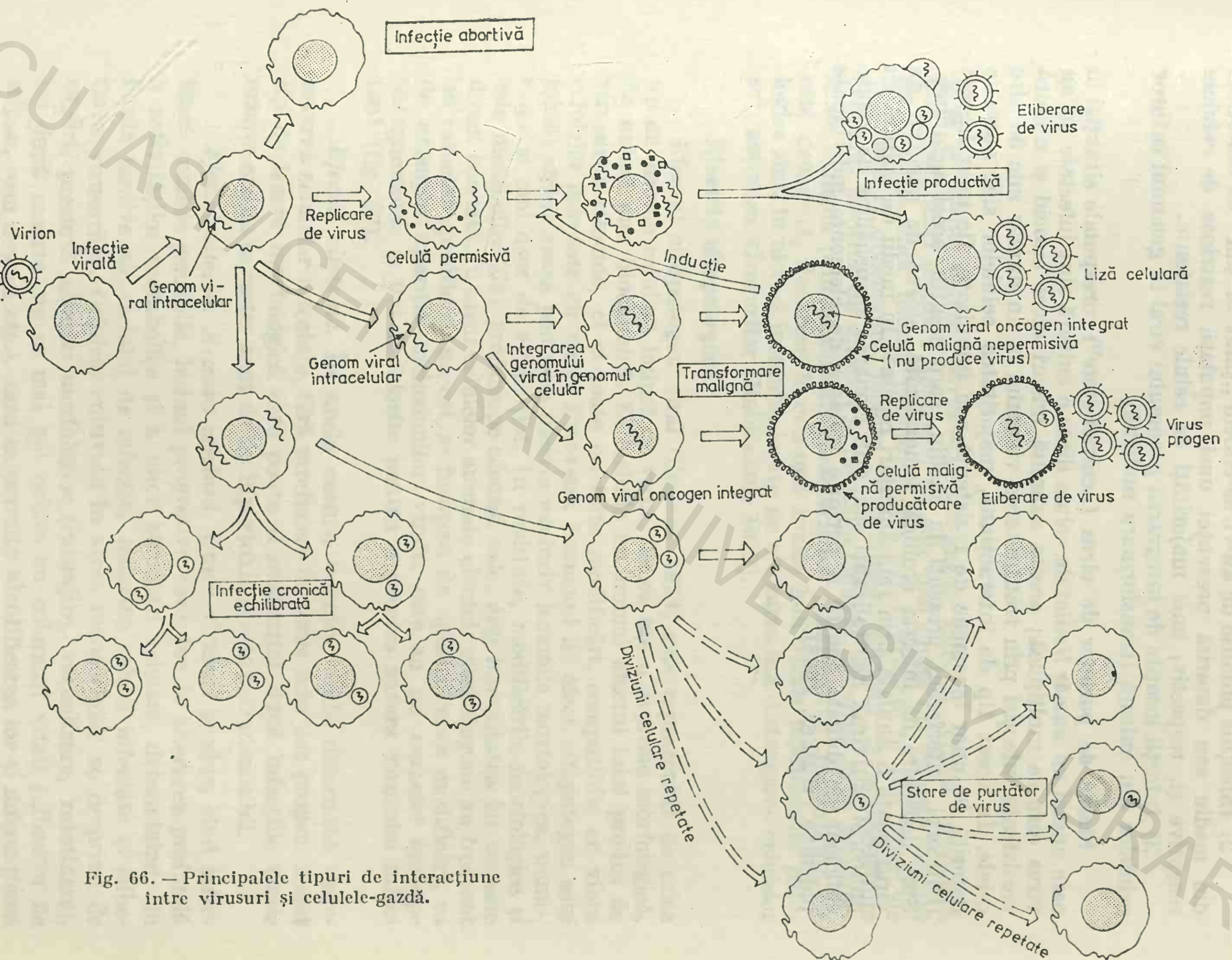


Fig. 66. — Principalele tipuri de interacțiune între virusuri și celulele-gazdă.

2) Infecţiile produse de un virus citocid „ţinut în şah" de inhibitori din mediu sau datorită prezenţei unei populaţii restrînse de celulele receptive şi, respectiv, unei majorităţi de celule rezistente.

3) Infecţii însoţite de integrarea genomului viral în genomul tuturor celulelor din cultură (transformare malignă).

Starea de purtător de virus („carrier state") corespunde situaţiei în care numai un *număr limitat* de celule dintr-o cultură sînt infectate cu un virus care se multiplică; acesta exercită uneori efect citocid şi asigură persistenţa infecţiei prin transmiterea virusului la un număr mic de alte celule. În acest tip de interacţiune, majoritatea celulelor sînt normale datorită fie unor fenomene de rezistenţă sau imunitate, fie unor factori (anticorpi, interferon) prezenţi în mediu, care menţin acest echilibru. Spre deosebire de infecţia cronică, generalizată, starea de purtător de virus poate fi anulată prin reînsămînţări repetate în medii de cultură cu anticorpi antivirali neutralizanţi sau prin clonarea suspensiilor de celule suficient de diluate pentru a permite izolarea de elemente individuale indemne (Walker, 1968).

Patologia celulelor infectate cu virusuri

(Pl. 17— 19)

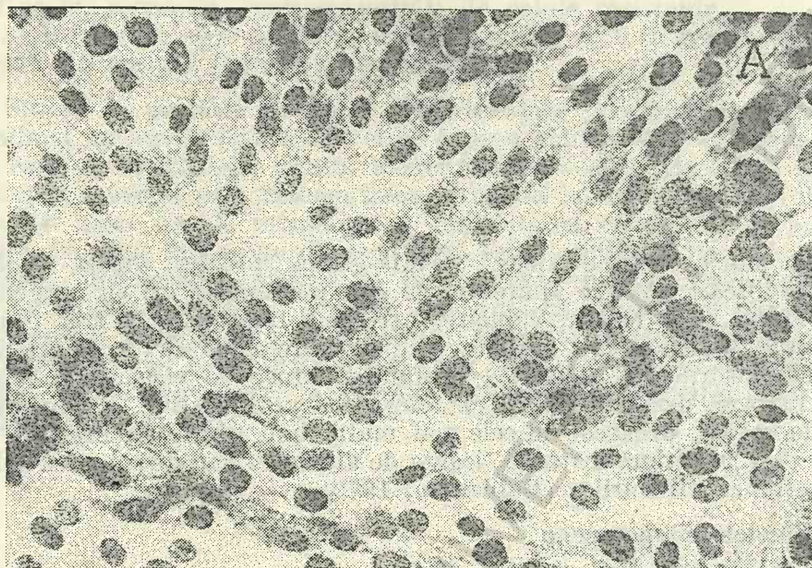
Deşi în unele sisteme virus — celulă-gazdă infecţia virală evoluează fără modificări celulare aparente, de cele mai multe ori ea este corelată cu apariţia unor leziuni celulare, care pot fi grupate în trei tipuri de răspuns: 1) degenerare, moarte şi distrugere celulară; 2) supravieţuire celulară, însoţită de alterări ± profunde induse de virus şi 3) transformare malignă prin modificări caracteristice proliferative. Importanţa lor este deosebită, deoarece în cele mai multe boli virale modificările patologice sînt, în ultimă instanţă, legate de alterarea sau distrugerea celulelor sub acţiunea virusurilor (Bablanian, 1972).

Efectele citopatogene

Efectul citopatogen viral (Enders, 1954) este reprezentat de orice tip de leziune celulară indusă de virus, fie că are o expresie morfologică, fie numai una biochimică. El include nu numai efectul letal produs de virusurile citocide, ci şi toate celelalte modificări, compatibile cu viaţa celulelor infectate cu virus. Frecvent, termenul de efect citopatogen este folosit *stricto sensu* pentru a descrie exclusiv leziunile morfologice, numeroase şi mai uşor de evidenţiat. În realitate, modificările morfologice şi cele metabolice sînt produse pe aceeaşi cale, deşi intensitatea lor nu este direct corelată. În cazul celulelor animale efectele citopatogene au frecvent un caracter specific şi, uneori, se însoţesc de apariţia unor modificări, ca de exemplu apariţia incluziunilor virale, care au un caracter aproape patognomonic şi pot fi folosite pentru a preciza natura virusului infectant (fig. 67).

Efectul citotoxic. În unele cazuri, infecţia virală determină degenerarea celulelor infectate, fără producere de virus infecţios progen. Acest tip de lezare morfologică care poate fi evidenţiat după infecţiile virale masive are un caracter acut de tip hipertoxic şi este netransmisibil.

Efectul citocid. Necroza celulară. Unele virusuri produc, cînd infectează celulele sensibile, leziuni progresive care duc la alterarea profundă a activităţilor metabolice şi a unor structuri celulare, determinînd, în fazele tardive ale ciclului de infecţie, moartea celulei infectate şi eliberarea virusurilor. Celulele cultivate în strat monocelular se desprind de suport, prezintă alterări morfologice (rotunjire, vacuolizare, ratatinare), iar după moarte nu se mai pot colora cu coloranţi vitali (albastru de tripan, roşu neutru etc.), ceea ce permite identificarea lor şi diferenţierea de celulele vii.



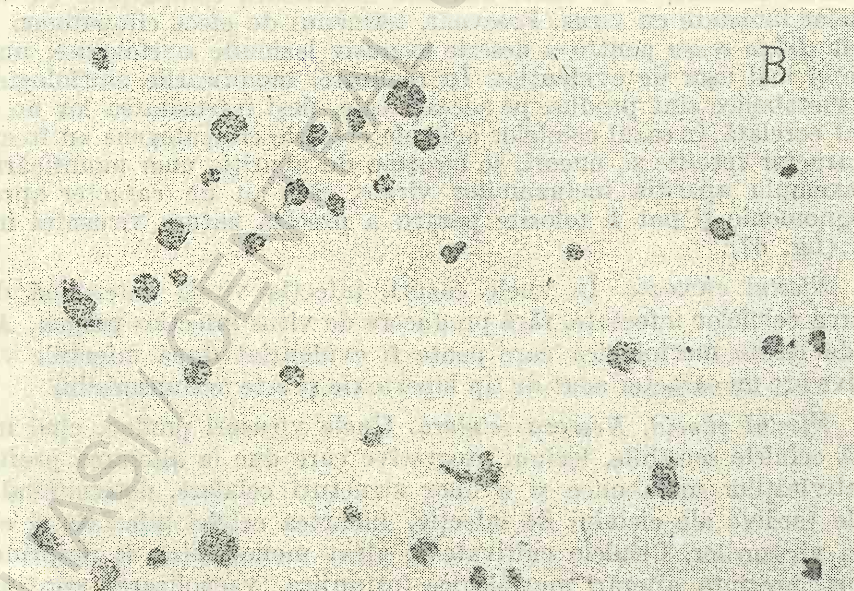


Fig. 67. — A. Cultură de celule normale din rinichi de maimuță în strat monocelular. B. Efectul citopatogen după 18 ore de la infectarea cu *Poliovirus* (după Beale, 1957).

Mecanismele moleculare ale efectului citopatogen

Bazele moleculare ale efectului citopatogen nu sînt complet elucidate. Patru mecanisme distincte pot concura la producerea acestui efect:

1. *Interferența cu procesul de biosinteză a constituenților celulari macromoleculari.* În mod normal, constituenții macromoleculari au un turnover $\pm$ intens. Permanent, unii dintre ei sînt degradați și reînnoiți prin sinteza continuă a celor mai multe macromolecule esențiale, independent de rata de creștere. Infecția virală inhibă procesele de resinteză prin așa-numitul „efect de întrerupere", în timp ce procesele degradative continuă, ducînd la modificări structurale și funcționale care ajung la un moment dat incompatibile cu viața celulei.

Mecanismul molecular al fenomenului de întrerupere este relativ puțin cunoscut și variază după natura macromoleculelor implicate. Astfel, inhibarea sintezei proteinelor s-ar datora degradării polisomilor (Joklik, 1966), în timp ce inhibarea activității ARNm celular incapacității lui de a se reasocia cu ribosomii celulelor infectate (Willems și Penman, 1966).

În unele cazuri, inhibarea sintezei macromoleculelor celulei-gazdă poate fi determinată de modificări induse în starea fizică a ADN care, probabil, își pierde eficiența de a acționa ca matriță, în urma leziunilor induse în nucleu și nucleol. Se sintetizează tot mai puțini ribosomi noi și mai puțin ARNm celular, în așa fel încît singurii ribosomi liberi pentru sinteza proteinelor virale rămîn cei prezenți în celulă în momentul infecției. În unele cazuri, de exemplu în cursul infecției masive cu virus vaccinal, sinteza proteinelor gazdei scade cu 90% după două ore, în timp ce proteinele virale sînt sintetizate eficient.

2. *Pierderea funcțiilor normale ale membranei celulare* indusă de interferența dintre infecția virală și biosintezele celulei-gazdă, ca și înlocuirea proteinelor celulare de membrană cu proteine virale duc la incapacitatea de a menține mediul ionic intracelular, diminuă transportul de nutrienți esențiali în celulă și eliminarea produșilor de uzură.

3. *Apariția corpilor de incluziune*, care au frecvent rol în morfogeneza virusurilor și creșterea dimensiunilor lor, determină diferite efecte mecanice prin deplasarea organitelor celulare și interferența cu procesele de transport intracelular.

4. *Scăderea rezistenței membranelor lizosomale* are drept urmare eliberarea enzimelor hidrolitice în citoplasmă și, prin aceasta, agravarea efectelor celorlalte mecanisme celulare. În cazul celulelor animale, modificările lizosomale care determină efecte citopatogene evoluează în trei etape (Allison, 1971), corespunzînd unor alterări cu gravitate crescîndă: 1) activarea membranelor lizosomale care prezintă permeabilitate crescută, cu menținerea hidrolazelor localizate în interiorul lizosomilor (această fază este reversibilă); 2) difuziunea enzimelor lizosomale în citoplasmă și absorbția lor secundară în nucleul celulei infectate, asociată cu modificări morfologice (rotunjirea celulei) și pierderea capacității de a se colora vital și 3) fragilizarea membranelor lizosomale și distrugerea progresivă a acestora urmată de efect citocid prin autoliza celulelor.

Alte mecanisme implicate în producerea efectului citopatogen. În unele cazuri, efectul citopatogen, inclusiv manifestarea sa extremă

— moartea şi distrugerea celulară — pot fi consecinţa sintezei unor proteine precoce care diminuă sinteza de ADN, ARN şi proteine celulare. Acest efect se manifestă rapid şi sever în cazul unor virusuri *(Pox-, Herpes-* şi *Picornavirus)*, în timp ce la altele apare tardiv şi treptat (Bablanian, 1972). Mecanismul este acelaşi atît în cazurile cînd se produc virioni infecţioşi, cît şi atunci cînd efectul este pur citotoxic. În sprijinul acestei ipoteze pledează faptul că efectul citopatogen al poliovirusurilor, ca şi al virusurilor *Pox* este corelat cu sinteza şi acumularea în celulă a unor proteine induse de virus. Dealtfel, efectul citopatogen al virusului vaccinal poate fi reprodus pe celule neinfectate, prin tratarea lor cu o serie de componenţi specific virali izolaţi în stare pură (Birbeck şi Stephen, 1970).

Modificările induse de adenovirusuri în celulele infectate pot fi reproduse prin intermediul unor proteine structurale de virioni (antigenele din pentoni şi fibrele capsidale), iar cele ale herpesvirusurilor printr-o lipoproteină virală (Tokuman, 1968).

Efectul citopatogen poate fi indus şi de unele proteine virale structurale (de capsidă), care adesea sînt toxice şi pot reprezenta cauza majoră a leziunilor. În aceste cazuri, efectul citopatogen apare în urma acumulării lor tardive, în cursul ciclului de multiplicare, sau poate fi provocat la animale de laborator foarte precoce dacă se injectează cantităţi mari de virus.

Antigenele de fibră ale adenovirusurilor determină o scădere globală a sintezelor de ADN, ARN şi proteine celulare şi virale. Această inhibare globală a sintezelor care generează efecte citotoxice nu trebuie confundată cu inhibarea specifică a sintezelor celulare, produsă de proteinele precoce virale, care nu afectează sinteza de virus şi care are un rol esenţial în replicarea virusurilor.

Modificările determinate de efectul citopatogen viral

Efectul citopatic determină o serie de modificări variabile ale morfologiei şi ultrastructurii celulelor afectate, care includ: a) contractarea celulelor lezate, care devin mai mici, se rotunjesc şi prezintă o citoplasmă granulată *(Arbovirus)*; b) mărirea celulelor însoţită de rotunjirea lor, creşterea refringenţei şi apariţia tendinţei la agregare în grupuri *(Adenovirus)*; c) vacuolizarea citoplasmei (virusurile vacuolante tip SV40), precum şi alterări nucleare sau citoplasmatice cu diferite grade de intensitate, ca: alterări ale cromatinei nucleare (marginarea cromatinei, picnoza), modificări nucleolare, alterări ale aparatului Golgi şi/sau ale mitocondriilor, modificări ale citoplasmei, poliribosomilor, lizosomilor, membranei plasmatice şi reticulului endoplasmic.

Efectul citocid şi de distrugere litică a celulelor infectate cu virus se exteriorizează în culturi celulare monostratificate prin modificări de tipul „plajelor", similare celor determinate de bacteriofagi pe o „pînză" de cultură bacteriană. Ele apar ca zone clare în mijlocul unui strat confluent de celule normale şi provin din distrugerea unui număr de celule învecinate, de obicei ca rezultat al multiplicării unei singure particule virale. Capacitatea unui virus de a forma plaje este condiţionată de intensitatea modificărilor citopatice induse şi în special de amploarea distrugerii celulare. Forma şi mărimea plajelor pot furniza date utile pentru

identificarea virusului. Virusurile care nu induc distrugeri celulare nu pot produce plaje.

Nevoia de energie face ca replicarea masivă a virusurilor să se facă numai în celulele care nu mor repede, chiar dacă sînt lezate. În cazul virusurilor foarte litice, replicarea masivă este posibilă numai dacă virusurile preiau foarte rapid, după infecţie, aparatul de sinteză al celulei-gazdă şi se multiplică intens, în timpul scurt cît acesta funcţionează încă.

Aberaţiile cromosomale. Infectarea liminară a unor celule parţial permisive cu unele virusuri *(Adenovirus, Vaccina, Herpes-, Paramyxo-, Leucovirus)* este însoţită de apariţia unei mari varietăţi de efecte asupra cromosomilor, de la ruperea unor cromatide pînă la fragmentare şi mai rar „pulverizarea" lor. Este puţin probabil ca aceste modificări să fie rezultatul unei interacţiuni directe între genomurile virale şi cele celulare.

Ele apar fie ca rezultat al unor leziuni nespecifice produse de nucleazele eliberate din lizosomi, către sfîrşitul ciclului de infecţie, fie reprezintă exteriorizarea tardivă şi indirectă a unor modificări biochimice mult mai precoce, situate uneori la distanţă de genomul celular (Allison, 1967).

Fuziunile celulare. Celulele infectate cu unele virusuri cu înveliş extern *(Herpes-, Paramyxovirus* etc.) au frecvent tendinţa de a fuziona prin membranele lor celulare, producînd uneori sinciţii gigante, sub forma unor mase de citoplasmă, delimitate de o membrană, care pot include sute sau chiar mii de nuclei (Poste, 1972). Fuziunile pot avea loc nu numai între celule identice, ci şi între celule diferite şi pot fi induse atît de virusul activ, cît şi de cel inactivat.

Evoluţia procesului de fuziune poate fi urmărită cel mai bine în culturi de celule inoculate cu virusul Sendaï *(Paramyxovirus)* care acţionează cu mare eficienţă ca agent fuzionant.

Virusul activ (infecţios) produce fuziuni, dar multiplicarea lui omoară celulele. Iradierea virusului îi distruge puterea infecţioasă păstrînd-o pe cea hemaglutinantă, care este paralelă cu capacitatea de a induce fuziunile celulare. De aceea, fazele procesului de fuziune celulară au fost urmărite cu ajutorul virusului inactivat. O particulă virală aflată în asociere strînsă cu membranele a două celule diferite fuzionează cu ambele, permiţînd formarea unor punţi citoplasmatice, care se extind ducînd la fuzionarea completă a celor două celule. Principiul fuzionant este prezent la toate paramixovirusurile în învelişul viral şi este reprezentat de o proteină specifică polifuncţională („proteina F") implicată în iniţierea infecţiei celulelor (prin fuziunea virionului cu membrana celulei normale sensibile), în hemoliza indusă de virus şi în fuziunea celulară. „Proteina F" îşi exercită rolul numai dacă este inclavată în stratul dublu lipidic al învelişului celular şi dacă este menţinută în contact strîns cu membrana celulară prin intermediul hemaglutininelor.

Formarea de heterocarioni. În prezenţa a două tipuri de celule (A şi B), procesul de fuziune produce fie *homocarioni* (de tipul A + A sau n × A), ca în cazul infectării unui singur tip de celule, fie *heterocarioni**)

---

*) *Heterocarion* = celulă bi- sau multinucleată rezultată din asocierea unor nuclei genetic diferiţi într-o citoplasmă comună, spre deosebire de *homocarion*, în care nucleii sînt genetic identici. Proprietatea de a fi hetero- sau homocariotic este numită *heterocarioză* şi respectiv *homocarioză* (Rieger, 1976).

(de tipul nA + n'B). Heterocarionii pot prezenta activități metabolice timp de cîteva săptămîni, pot sintetiza ADN și ARN, dar nu se pot multiplica în stare multinucleată.

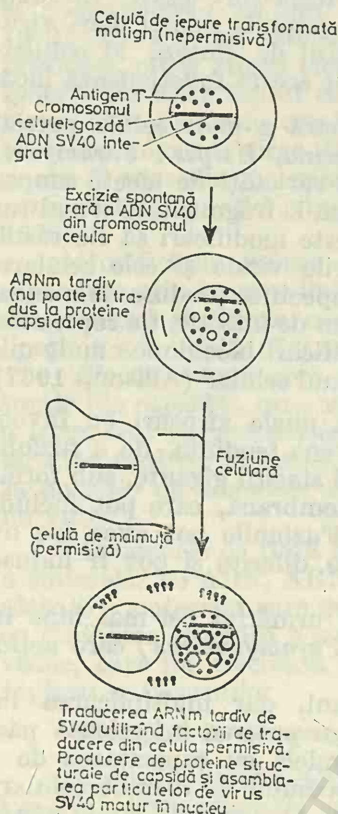


Fig. 68. — Evidențierea prezenței virusului SV40 într-o celulă nepermisivă de iepure, după fuzionarea acesteia cu o celulă de maimuță. Într-o mică proporție din celulele nepermisive, genomul SV40 este excizat din cromosomul celulei-gazdă, putînd exista temporar ca o moleculă liberă de ADN SV40 (episom). După fuziunea cu o celulă permisivă, virusul SV40 este evidențiat numai în celulele în care s-a găsit în stare liberă.

Procesul de multiplicare poate avea loc în cazul heterocarionilor binucleari, numai dacă cei doi nuclei intră în mitoză în același timp, formînd un fus unic, toți cromosomii aliniindu-se în aceeași placă ecuatorială. Se formează astfel două celule-fiice mononucleate, numite sincarioni*), fiecare dintre ele conținînd în nucleu cromosomii celor două celule parentale.

În continuare, sincarionii se pot multiplica numai dacă repartizarea cromosomilor parentali se face regulat. În cazurile în care multiplicarea sincarionilor este asigurată ei devin hibrizi și posedă, în principiu, o parte din cromosomii celulelor parentale.

Evoluția lor în cursul diviziunilor viitoare este variabilă: unii persistă ca atare fără modificări importante (de ex., hibridul șoarece — șoarece), în timp ce alteori, cromosomii uneia din celulele parentale sînt eliminați pe măsură ce mitozele se repetă (de ex., în cazul cuplului de celule șoarece—om cromosomii umani dispar ± rapid).

Aplicații practice. Formarea de heterocarioni este utilizată în practică, între altele, pentru a releva prezența în celulele unor mamifere a unor virusuri oncogene. Celulele unor mamifere (hamster) transformate de virusul sarcomului Rous sau de SV40 păstrează integral informația genomului viral, deși nu permit multiplicarea virusului și producerea spontană de virioni. Cultivate în comun (cocultivare) cu *celule permisive* (celule de pui de găină pentru VSR sau celule de maimuță pentru SV40), în prezența virusului Sendai ca agent fuzionant, ele eliberează virus identic cu virusul transformant (fig. 68).

Inducția replicării este determinată de formarea de heterocarioni care permit, prin-

*) *Sincarion* = nucleul unui zigot rezultînd din fuziunea nucleilor (cariogamie) unor gameți ♂ și ♀ în cursul fertilizării. Sincarionii care reunesc două genomuri aparținînd la două organisme diferite pot fi produși prin hibridizarea celulelor somatice (Harris, 1970).

tr-un mecanism încă neelucidat, exprimarea integrală a informației genetice virale represate în celula transformată *(nepermisivă)*.

În celulele infectate cu doze mici de virus capabile să inducă fuziuni celulare, debutul fuziunii apare în faza tardivă a ciclului de replicare și coincide cu asamblarea virusului progen. Fenomenul este numit *fuziune din interior*.

Un al doilea tip de fuziune — *fuziunea din exterior* — apare numai după expunerea la doze mari de virioni infecțioși și neinfecțioși (mai multe mii de particule per celulă) și este indus independent de procesul de replicare. Această formă de fuziune apare rapid, în 1—3 ore de la expunere.

Policariocitoza indusă de virusuri este condiționată de caracteristicile genetice ale virusurilor și ale celulelor-gazdă. Spre exemplu, herpesvirusurile produc policariocite mari cu celulele HeLa, nu însă și cu fibroblaștii umani.

Mecanismele moleculare ale fuziunilor celulare nu sînt cunoscute. Ele s-ar realiza ca o consecință a modificării glicoproteinelor din membranele celulare sub acțiunea enzimelor lizosomale și implică fuziunea membranelor a căror structură a fost reorganizată fundamental de infecția virală. Procesul, condiționat de un consum de energie, pare să fie mai mult de natură biofizică decît biochimică (Rott și Klenk, 1977).

Incluziunile virale (Pl. 19)

Numite și *corpi de incluziune*, incluziunile sînt neoformații produse de virusuri în celulele parazitate și reprezintă împreună cu paracristalele virale modificarea morfologică cea mai caracteristică a celulelor infectate.

Forma lor poate fi rotundă, ovalară, piriformă sau neregulată, după natura virusului infectant, iar dimensiunile sînt cuprinse între 1 și 30 µm, ceea ce le face vizibile la microscopul optic. Unice sau multiple, ele sînt dispuse intracitoplasmatic (vaccină, rabie, oreion), intranuclear *(Herpes*, varicelă, *Adeno-*, *Poliovirus)* sau intracitoplasmatic și intranuclear (variolă, zona zoster etc.). Unele incluziuni sînt mai cunoscute după numele autorilor care le-au descris, de ex., corpii Babeș-Negri (rabie), corpii Guarnieri *(Vaccina)* sau incluziunile lui Cowdry *(Herpes)*, (fig. 69).

Incluziunile reprezintă zone din celule cu comportare tinctorială modificată. În general, în stadiile precoce sînt bazofile și pot fi Feulgen-pozitive, datorită prezenței acizilor nucleici în constituția lor; în stadii tardive ele devin acidofile. Unele incluziuni (vaccină, herpes, rabie, rujeolă) sînt în mod caracteristic acidofile, cele intranucleare produse de adenovirusuri sînt constant bazofile.

Semnificația lor biologică este evidentă și din faptul că se dezvoltă progresiv, pe măsură ce ciclul de multiplicare al virusurilor progresează, reprezentînd deci corespondenți morfologici ai procesului dinamic prin care celula produce virus (Buddingh, 1953). Ele reprezintă în general „fabrici" de virus, adică zone localizate („focare") în care se produce sinteza acizilor nucleici, a proteinelor virale și asamblarea virionilor. Natura virală a corpilor de incluziune a fost demonstrată, în unele cazuri, cu ajutorul microscopiei electronice (Dalton, 1972), al autoradiografiei sau al imunofluorescenței.

În fazele tardive ale infecției, ca și după aceea, incluziunile sînt lipsite de virus infecțios, dar indică prin specificitatea și localizarea lor sediile celulare ale procesului de producere a virusului. Datorită acestui

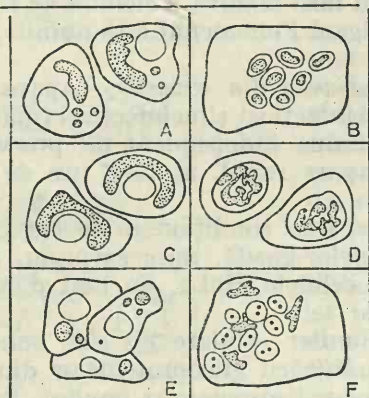


Fig. 69. — Incluziunile virale. A. *Vaccina:* incluziuni citoplasmatice acidofile (corpi Guarnieri). B. *Herpes-simplex virus* : incluziuni tip B (corpusculi Cowdry) ; fuziunea celulară produce sinciții. C. *Reovirus* : incluziuni intracitoplasmatice perinucleare acidofile. D. *Adenovirus* : incluziuni intranucleare bazofile. E. *Rabiesvirus* : incluziuni intracitoplasmatice acidofile (corpusculi Babeș-Negri). F. Virus rujeolic *(Morbillivirus)* : incluziuni intranucleare și intracitoplasmatice acidofile ; fuziunea celulară produce sinciții (după Fenner, 1974).

fapt, prezența unor asemenea incluziuni reprezintă un indicator prețios pentru demonstrarea naturii virale a unor leziuni, iar morfologia și dispoziția lor caracteristică în anumite celule constituie un important criteriu de diagnostic în unele viroze. Astfel, punerea în evidență a incluziunilor rabice — corpusculii lui Babeș-Negri — în neuronii din cornul lui Ammon permite precizarea diagnosticului de turbare la omul și animalele suspectate de a fi murit în urma acestei boli.

În anumite cazuri, incluziunile nu sînt direct legate de multiplicarea virusurilor, în geneza lor fiind implicate unele organite celulare. Astfel, virusul citomegalic produce incluziuni virale mari intracelulare și, în plus, incluziuni eozinofile intracitoplasmatice, reprezentînd mari agregate de lizosomi (McGavran, 1965).

Semnificația practică a efectelor citopatogene

În unele cazuri, efectul citopatogen este caracteristic pentru un anumit virus, prin natura celulelor afectate, sediul și caracterul leziunilor etc., astfel încît poate da indicații utile, deși nu totdeauna patognomonice, asupra identității virusului producător (Rapp și Melnick, 1967).

Deși timpul de apariție a efectului citopatogen depinde, într-o oarecare măsură, de numărul de virioni prezenți în produsul patologic care furnizează inoculul și de rata de replicare a virusului respectiv, natura modificărilor produse, capacitatea de a determina efecte citopatogene în anumite celule, fără a afecta vizibil altele, facilitează adeseori identificarea ulterioară a virusului în cauză.

Modificările metabolice și structurale induse de virusuri la nivel celular, care constituie efectul citopatogen, pot fi utilizate ca ghid în studiul modificărilor patologice ale organismului. Deoarece, în ultimă instanță, modificările patologice caracteristice celor mai multe boli virale sînt corelate cu alterarea sau distrugerea anumitor celule de către virus, cunoașterea mecanismelor prin care este indus efectul citopatogen se dovedește esențială pentru înțelegerea patogeniei bolilor virale.

Relațiile dintre virusuri și organismul-gazdă

Replicarea virusurilor în organism este influențată de proprietățile virusului și de trei particularități multicomponente aparținînd gazdei : 1) numărul de celule receptive și posibilitatea de acces a virusului la ele; 2) ușurința cu care celulele individuale suportă replicarea virusului și 3) intensitatea și complexitatea reacțiilor de apărare care determină îndepărtarea sau inactivarea virusului și/sau a celulelor infectate (Smith, 1977).

Țesuturile animale au în structura lor diferite tipuri de celule, astfel încît nivelul lor global de receptivitate față de un anumit virus este influențat atît de numărul de celule sensibile din țesut, cît și de capacitatea lor individuală de a permite multiplicarea virusului.

Particularitățile celulelor-gazdă și ale mediului lor care controlează replicarea virală au fost numite *factori de replicare*, prin analogie cu factorii de creștere (nutrienți esențiali) ai bacteriilor (Smith, 1977).

Tropismul virusurilor

Tropismul sau afinitatea virusurilor pentru anumite specii de plante sau animale *(genotropism)*, pentru anumite țesuturi *(histotropism)* sau pentru anumite celule *(citotropism)* reprezintă o proprietate biologică importantă, deoarece determină particularitățile de patogenitate ale virusurilor, ale celor animale în special. Astfel, în timp ce o serie de virusuri (vaccinal, rabic) pot infecta un număr mare de specii animale (cu condiția utilizării unei doze suficient de mari), altele (poliovirus, virus gripal) sînt limitate în condiții *naturale* numai la o singură gazdă (omul). Afinitatea virusurilor pentru anumite țesuturi se determină, în general, prin injectarea intravenoasă a suspensiei infectante la un animal sensibil, urmată după sîngerarea animalului de cercetarea prezenței și cantității virusului în fiecare organ sau țesut în parte.

În raport cu această proprietate, virusurile pot fi clasificate în următoarele categorii : a) *virusuri dermotrope*, cu afinitate pentru piele și mucoase *(Poxvirus)*; b) *virusuri neurotrope*, cu afinitate pentru sistemul nervos central (rabic, encefalitice, polio); c) *virusuri dermoneurotrope*, cu afinitate pentru piele și sistemul nervos central *(Herpes)*; d) *virusuri organotrope* (sau viscerotrope) cu afinitate pentru organele interne (febra

galbenă, virus denga); e) *virusuri pantrope*, cu afinitate pentru celulele sistemului reticuloendotelial etc.

Este de menţionat însă, că, în unele cazuri, localizările considerate ca definitorii pentru tropismul unui virus reprezintă o fază finală în patogeneza infecţiei virale respective. Astfel, poliovirusul este în mod esenţial un enterovirus, adică un virus enterotrop, cu afinitate pentru intestin (care şi constituie poarta lui de intrare în organism), dar, vehiculat prin sînge la nivelul sistemului nervos central, el infectează şi lezează neuronii motori, ceea ce determină în final caracterul său neurotrop.

Citotropismul poate fi definit drept capacitatea unui virus de a se multiplica mai activ într-un tip de celulă decît în altul. Deşi virusurile sînt citotrope prin definiţie — fiind parazite intracelulare obligate — această particularitate se manifestă cu precădere pentru anumite celule, de exemplu celule cu cariokineze frecvente — normale sau patologice — sau cu anumită localizare, structură sau funcţie în organism. Spre exemplu, poliovirusul nu se poate multiplica în orice celulă nervoasă, ci numai în neuronii motori din coarnele anterioare ale măduvei. Această afinitate este determinantă pentru manifestările clinice ale bolii, care este caracterizată prin paralizia muşchilor din teritoriul corespunzător neuronilor distruşi.

Specificitatea de gazdă şi de ţesut nu este întotdeauna — în mod obligator — un fenomen de tipul „tot sau nimic". Ea se referă mai ales la situaţia în care diferenţele în intensitatea replicării virusurilor în diferite gazde sau în diferite ţesuturi sînt substanţiale şi semnificative în raport cu producerea bolii (Smith, 1977).

Multiplicarea virusurilor în organism poate să producă, în funcţie de interrelaţiile dintre ele şi gazdă, mai multe tipuri de răspuns: infecţia aparentă acută, infecţia inaparentă, infecţii persistente cu diferitele lor modalităţi de evoluţie: infecţii cronice, infecţii lente, infecţii latente, precum şi transformare malignă.

Multiplicarea virusurilor în organism este o condiţie esenţială premergătoare apariţiei bolii, dar ea nu determină totdeauna o stare de boală.

Tipurile de infecţii virale

Infecţiile acute. Virusurile animale produc frecvent infecţii acute cu o durată limitată, la om şi animale. La nivel celular, infecţiile acute evoluează ca infecţii productive, în cursul cărora virusul este replicat cu producere de virus progen şi, în unele cazuri, cu moarte celulară. Sfîrşitul acestor infecţii este în funcţie de virulenţa agentului patogen şi de intensitatea reacţiilor de apărare ale sistemului imunitar. De cele mai multe ori, virusul este eliminat din organism, lăsînd, după caz, o stare de imunitate mai mult sau mai puţin solidă.

Infecţiile inaparente corespund situaţiilor în care infecţia şi multiplicarea virusurilor nu sînt însoţite de manifestări clinice. Virusul este de regulă eliminat din organism lăsînd o stare de imunitate (prezenţa anticorpilor serici).

Infecțiile persistente. Unele virusuri pot produce infecții de lungă durată (persistente), care pot fi de mai multe tipuri: *infecții cronice* cu producere continuă de virus, adesea timp de mai mulți ani, uneori urmînd unei stări de boală (de ex., hepatita B), și *infecții latente* în cursul cărora infecția virală este cel mai adesea inaparentă și neînsoțită de producere de virus nou. Unele virusuri pot produce atît infecții cronice, cît și latente și uneori cele două tipuri pot apărea la același animal, de aceea cele două tipuri de infecții sînt foarte greu de deosebit la nivel de organism (Tovey, 1980).

Infecțiile lente, denumite impropriu infecții cu virusuri lente („slow virus infections") (Sigurdson, 1954), formează un grup avînd drept caracteristici incubația foarte lungă, evoluție progresivă și lentă, datorită persistenței virusului în organismul-gazdă, fără a omorî celulele pe care le parazitează și fără a produce semne de infecție. Ele pot determina sau declanșa boli cronice degenerative la om și animale (Holland, 1974). Patogenia lor este controversată. Virusurile „lente" ar avea o rezistență extraordinară față de reacțiile răspunsului imun normal și ar scăpa de efectele acestuia, dar prezența și persistența lor în organism ar fi înregistrate de sistemul imun, ale cărui răspunsuri cumulate ar fi răspunzătoare de leziunile produse. Cele mai cunoscute infecții lente (bolile Kuru, Jakob-Creutzfeldt la om și tramblanta oilor, scrapie) ar fi datorate viroizilor și nu virusurilor. Există însă și infecții lente tipic virale, ca boala Visna (panencefalita ovinelor) produsă de un retrovirus sau panencefalita sclerozantă subacută produsă de un paramixovirus. Date preliminare — dar nu suficient de concludente — pledează pentru ipoteza că o serie de boli umane degenerative (scleroza multiplă, artrita reumatoidă, unele neuropatii, dermatomiozite și unele boli sistemice) ar putea fi rezultatul unor infecții virale lente și inaparente (Holland, 1974).

Infecțiile cronice au o evoluție îndelungată datorită incapacității reacțiilor de apărare ale organismului de a elimina virusul din organism (din anumite țesuturi, organe sau chiar din circulația sanguină). Foarte multe infecții cronice evoluează fără manifestări clinice evidente. În unele cazuri, infecțiile cronice pot determina, în general, după o perioadă îndelungată de evoluție, fie îmbolnăviri cu caracter malign (leucoze aviare, leucemia murină), fie complicații imunopatologice de tipul glomerulonefritelor cu complexe imune. Infecția virală cronică cea mai cunoscută datorită gravității ei pentru om este *hepatita serică de tip B.*

Virusul hepatitei B (HB), (pl. 19). Sedimentele obținute prin centrifugarea înaltă a serului sanguin al bolnavilor, în faza inițială a hepatitei B, conțin trei tipuri de particule vizibile la microscopul electronic: a) *particule sferice* cu ∅ 22 nm (16—25 nm); b) *particule tubulare* cu ∅ 22 nm (50—230 nm), care prin disociere produc particule sferice și c) particule cu dimensiuni constante și ∅ 42 nm, sub denumirea de *particule Dane* (1970); particulele Dane sînt mai rare ($\sim 10^9$/ml) comparativ cu celelalte tipuri ($\sim 10^{14}$/ml) și corespund virionului matur infecțios, reprezentînd singurul tip de particulă care conține ADN (fig. 70). Există chiar o corelație directă între numărul particulelor Dane și riscul de infecție.

Particula Dane are o formă sferică şi este formată din două structuri concentrice. Zona internă, numită „corpul central" al virionului, cu Ø 28 nm, avînd rolul de nucleocapsidă, este eliberată după degradarea

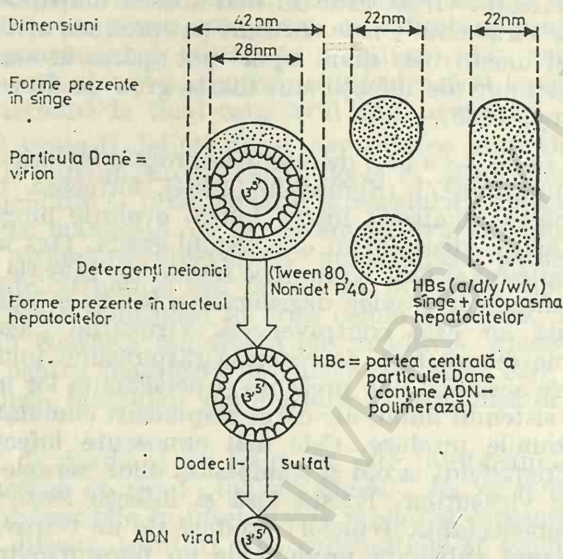


Fig. 70. — Virusul hepatitei B. Tipurile de structură şi relaţiile dintre componentele structurale şi proprietăţile antigenice (după Pillet, 1979).

particulei Dane, cu ajutorul detergenţilor neionici (Tween 80). Genomul este reprezentat de o moleculă de ADN, lungă de 0,78 μm, constituită din două catene lineare, cu lungime inegală, una dintre molecule fiind mai scurtă cu 400 — 1 500 de nucleotide. Ca urmare, genomul este dublu catenar pe aprox. 2/3—3/4 din perimetru şi monocatenar pe restul de 1/3 — 1/4. Molecula de ADN este circularizată prin împerecherea celor două extremităţi monocatenare adezive. Acest tip de structură explică diferenţele de greutate moleculară între genomurile izolate din particule diferite. După unele date, moleculele de ADN din diferite particule ar fi eterogene din punctul de vedere al secvenţei bazelor, dar nu complet diferite (Robinson, 1977).

„Corpul central" conţine o enzimă, *ADN-polimeraza dependentă de ADN*, asociată cu genomul viral. Prezenţa acestei enzime este o excepţie în lumea virusurilor, deoarece nu a mai fost descrisă decît la un singur alt virus (al hepatitei marmotei). Pe acest criteriu, Hirschman (1979) grupează aceste două virusuri în grupul *3-D* (ADN — dependent ADN-polimeraza). ADN-polimeraza endogenă se leagă de extremitatea 3'OH a catenei scurte şi funcţionează ca o enzimă reparatoare care umple „golurile" din zona monocatenară a ADN. După reacţia cu ADN-polimeraza, lungimea moleculei circulare d.c. creşte cu 27%, ajungînd la 1,06 μm şi g.m. $\sim 2{,}1 \times 10^6$ dal (Hruska, 1977).

Particula Dane conține în structura sa două antigene:

Antigenul Australia (Blumberg, 1965) *sau de suprafață—HBs* („Hepatitis B surface antigen"), codificat de genomul viral, cu o structură particulată (g.m. ~2,4—3,5 × 10^6 dal) și o formă tubulară (∅ 20 nm, lung 50—230 nm și striații transversale cu o periodicitate de 3 nm). Conține 40—70% proteine, 3,6—6,5% glucide și ~30% lipide. El formează învelișul particulei Dane, fiind analog unui „înveliș viral". În mediu acid se disociază în forme rotunde, identice din punct de vedere chimic și antigenic. AgHBs conține un mozaic de determinanți antigenici, lipoproteine cu oze, asociate cu proteine serice, provenite din celula-gazdă și încorporate, în cursul asamblării sale, în învelișurile virale.

Antigenul HBc („core antigen"), cu ∅ de 27 nm, are o formă relativ hexagonală, sugerînd o simetrie icozaedrică, și este eliberat din particula Dane cu ajutorul detergenților neionici. Nu este niciodată liber, fiind constituent al corpului central al virionului asociat cu ADN-polimeraza. Este format din 2—3 polipeptide cu g.m. 16 000 — 90 000 dal. Prezența lui în ser la foștii bolnavi este corelată cu tendința de evoluție a bolii și/sau trecere spre cronicizare.

Structura neobișnuită a virusului HB ridică unele probleme legate de genetica și replicarea virusului respectiv. Nu se cunoaște rațiunea biologică a existenței unei porțiuni m.c. a ADN pe 1/3 — 1/4 din perimetru, compensată prin prezența unei enzime endogene capabilă să completeze acest hiatus în structura genomului. Existența unui genom ADN circular cu această structură, a unei ADN-polimeraze și a produsului său de sinteză, într-o poziție protejată în corpul central al virionului, corespunde unei situații unice la virusurile animale.

Întrucît cantitatea de informație genetică este insuficientă, pentru a codifica toți constituenții virali este posibilă existența unor „gene suprapuse" ca la poliom și SV40 prin citirea decalată a informației, fapt care ar multiplica de trei ori posibilitățile de codificare ale genomului.

Exprimarea antigenelor virale *HBs* și *HBc* se realizează cel mai adesea în celule distincte, respectiv în hepatocite diferite, fapt neîntîlnit la alte virusuri animale. Această comportare s-ar putea explica pe două căi: 1) particula Dane ar fi un virus defectiv, a cărui prezență nu s-ar manifesta decît în asociere cu un „virus helper" încă neidentificat; 2) datorită unui grad marcat de eterogenitate genetică, fiecare particulă Dane în parte s-ar comporta ca un virus incomplet, funcțiile caracteristice virionului matur fiind realizate prin asocierea mai multor particule Dane diferite (Robinson, 1978). Antigenul *HBs* ar reprezenta, în acest caz, forma defectivă externă, neinfecțioasă și lipsită de ADN.

Infecția cronică cu virus de hepatită B s-ar datora unui deficit al sistemului imunitar, la baza căruia ar putea sta două mecanisme: a) lipoproteinele învelișului viral ar fi îndeaproape înrudite antigenic cu cele umane sau ar fi parțial virale și parțial provenite din celula-gazdă, fapt care ar explica atît lipsa de eficacitate a răspunsului imun al organismului, cît și complicațiile de tip autoimunitar; b) bolnavul ar produce anticorpi fără acțiune neutralizantă, care, în schimb, formează complexe imune, virus — anticorp, ce se depun în rinichi, provocînd glomerulonefrite de

tip autoimun, sau în pereţii vaselor sanguine, determinînd reacţii inflamatorii.

Tulburările consecutive infecţiei cronice cu virus HB sînt determinate în mai mare măsură de antigenemia persistentă (respectiv de complexele antigen — anticorp) decît de viremie (prezenţa virusului infecţios în sînge).

Infecţiile latente. Virusurile din grupul *Herpes* infectează omul şi aproape toate speciile de animale testate. Infecţiile umane pot fi produse de virusuri hemotrope ca *Herpesvirus simplex*, HSV-2 şi virusul varicela-Zoster sau de virusuri limfotrope ca virusul Epstein-Barr (VEB) şi virusul citomegalic.

Infecţia cu HSV-1 are loc între 6 luni şi 5 ani după naştere, ca o stomatită acută (clinic evidentă numai în 10—15% din cazuri), iar cea cu HSV-2 ar apărea la începutul vieţii sexuale. În cursul primei infecţii, virusul se multiplică în celulele epiteliale, după care migrează pe calea axonilor pînă la ganglionii senzoriali şi autonomi, unde stabileşte o infecţie latentă, probabil în neuronii locali. După vindecarea primei infecţii, o parte din foştii bolnavi suferă recăderi cu leziuni care apar *la* sau *lîngă* acelaşi sediu, reprezentat de joncţiunea mucocutanată a buzelor, cornee sau cu localizare genitală. Apariţia leziunilor de recidivă este frecvent previzibilă urmînd după un şoc fizic sau emoţional, expunere la soare sau vînt, febră, menstruaţie sau după anumite medicamente.

În cursul fazei de latenţă, în ganglioni nu se pot detecta nici virusul infecţios, nici antigenele virale şi nici ARNm transcris de la genomul viral (Puga şi colab., 1978). Virusul este menţinut într-o stare în care nu poate fi afectat de mecanismele normale de apărare ale gazdei (Wagner, 1974). Singurul mijloc univoc capabil să demonstreze prezenţa virusurilor latente este hibridarea cu ajutorul acizilor nucleici.

Prezenţa sau absenţa anticorpilor nu dă indicaţii precise: prezenţa anticorpilor în absenţa virionilor sau a antigenelor virale poate fi expresia unei infecţii anterioare, după cum absenţa lor este regulă în cazul virusurilor transmise vertical, integrate în cromosomii celulelor germinative ale gazdei (Tovey, 1980).

Factorii activatori ai infecţiei latente acţionează probabil asupra celulei şi nu direct asupra virusului. Ei sînt, după Tovey (1980), de două tipuri: a) specifici pentru celulă, respectiv corelaţi cu un anumit tip particular de celulă infectată cu virus şi b) nespecifici pentru celulă, care activează infecţiile virale prezente într-o gamă largă de celule. Cei mai mulţi factori activatori şi în special cei nespecifici (inhibitorii sintezei proteinelor, substanţele imunosupresoare etc.) activează mai multe tipuri de virusuri latente.

Nu se cunoaşte încă mecanismul prin care stimulii îndepărtează blocajul transcrierii, al replicării genomului viral şi activarea infecţiei latente. HSV labial poate fi reactivat între două recurenţe fie prin lezarea ramurii senzitive a trigemenului (secţionarea ramurii motrice sau a celor aferente este fără efect), fie prin manipularea şi traumatizarea suprafeţei epiteliale, fie prin stimuli generali (agenţi imunosupresori), care afectează nivelul rezistenţei normale a organismului.

Bazele moleculare ale latenţei virale. În prezent nu se cunosc mecanismele biochimice care condiţionează latenţa virală, dar este evident că factorii care controlează stabilirea şi menţinerea stării de latenţă depind de tipul de celulă infectată cu un anume virus (Tovey, 1980). Astfel, HSV poate infecta productiv numeroase tipuri de celule, dar poate fi latent numai în neuroni. În alte cazuri, stabilirea infecţiei latente este condiţionată de stadiul de diferenţiere a celulei infectată cu virus.

După ipoteza „stării dinamice", virusul latent s-ar multiplica lent în „pungi" de ţesut infectat cronic, în acelaşi situs în care produce leziunile sau în situsuri regionale distanţate. Stimulii răspunzători de declanşarea recidivelor ar acţiona mărind sensibilitatea ţesuturilor respective. Împotriva acestei ipoteze pledează faptul că virusul nu este niciodată izolat în perioadele dintre recurenţe din regiunea în care se produce recidiva.

După ipoteza „stării statice", virusul latent este păstrat într-o celulă infectată neproductiv, iar recidiva (infecţia productivă) este indusă ca o consecinţă a unor acţiuni favorizante.

După Roizman (1974), HSV nu se păstrează latent în celulele în care se multiplică în mod normal, deoarece în ele găseşte, practic, toate condiţiile necesare multiplicării. În neuronii senzitivi însă, HSV nu găseşte aceste condiţii şi rămîne latent. Prezenţa lui a fost evidenţiată prin izolare, după culturi prelungite în neuronii senzoriali la iepure şi şoarece (Stevens, 1971), precum şi în ganglionul Gasser uman (Baringer, 1973). Trecerea de la starea nepermisivă la starea permisivă se face numai sub influenţa şocurilor favorizante al căror mod de acţiune nu este cunoscut.

Genomul viral prezent integral în celulă ar fi menţinut în stare neexprimată, datorită integrării sale în genomul gazdei (Stevens şi Cook, 1973).

Rolul reacţiilor de apărare ale gazdei în controlul infecţiilor latente. Numeroase fapte de observaţie pledează pentru ideea că reacţiile de apărare pot juca un rol important în stabilirea şi menţinerea infecţiilor.

Reactivarea virusurilor *Herpes simplex*, *Varicela-Zoster* şi citomegalic este frecvent observată în cursul diferitelor stări patologice sau după intervenţii chirurgicale (transplant renal) care necesită tratamente cu substanţe imunosupresoare.

În unele cazuri, se pare că anticorpii antivirali au un rol important în menţinerea infecţiei latente, deşi nu este clar cum, deoarece s-au observat cazuri de reactivare a virusului *Herpes simplex* chiar în prezenţa anticorpilor neutralizanţi şi a limfocitelor T (Fridman şi colab., 1980).

Infecţia cu virusul Epstein-Barr furnizează date noi privind intervenţia unor efectori ai stării de imunitate în evoluţia infecţiilor latente. Virusul Epstein-Barr (VEB) este un virus herpetic limfotrop care infectează majoritatea oamenilor. Infecţia tardivă (la adulţi sau adolescenţi) evoluează sub forma mononucleozei infecţioase.

VEB infectează o singură categorie de limfocite care poartă pe suprafaţa lor molecule de imunoglobuline (Ig) şi în mod preferenţial IgM şi receptorii de complement. Infecţia primară este urmată, pentru tot restul vieţii, fie de o infecţie cronică productivă, cu eliberare de virus infecţios în salivă, fie de o infecţie neproductivă.

Infecţiile neproductive cu VEB sînt de două tipuri:

a) *infecţii latente*, ca în herpes, în cursul cărora genomul viral poate fi activat de anumiţi stimuli, descrise la persoane seropozitive care au cîteva celule ce conţin genomul viral.

b) *infecţii latente neproductive cu transformare celulară malignă*, ca în cazul limfomului Burkitt sau al carcinomului nasofaringian. De la aceste cazuri au fost izolate şi cultivate *in vitro* linii celulare limfocitare de tip B care, deşi conţin numeroase copii de genom viral, au ciclul litic represat şi nu pot trece în faza productivă. Tratarea acestor celule cu anticorpi faţă de IgM are drept rezultat activarea virusului latent şi trecerea în faza productivă a infecţiei. Aceasta demonstrează că IgM de pe suprafaţa celulară ar putea avea un rol esenţial nu numai în infecţia cu VEB, ci şi în controlul reproducerii virusului, în stabilirea latenţei şi reactivării lui în celulele limfoide umane (Tovey, 1980).

Zona Zoster sau Herpes Zoster este o afecţiune determinată de activarea virusului varicelei caracterizată prin leziuni limitate la o zonă restrînsă în comparaţie cu infecţia acută, corespunzînd unui singur ganglion senzorial. Rară la tineri, are o frecvenţă şi gravitate crescînde cu vîrsta. Apare cu o frecvenţă de 3—5 ‰, mai ales odată cu anumite modificări limfoproliferative, după imunosupresie sau iradieri cu raze X.
Virusul persistă la adăpost de reacţiile de apărare ale organismului într-o formă necunoscută (integrat în genomul celulei-gazdă sau fizic autonom ca o plasmidă) în celulele unuia sau mai multor ganglioni senzoriali ai rădăcinilor dorsale şi ai nervilor cranieni senzitivi, producînd leziuni caracteristice, după reactivare, în regiunile corespunzătoare de inervare ale acestora (intercostale, faciale etc.).

Interferonii

Interferonul este o substanță antivirală cu spectru larg și acțiune nespecifică, avînd proprietatea de a inhiba replicarea oricărui virus în celulele speciei de care a fost produs sau ale unor specii strîns înrudite filogenetic. El a fost descoperit de Isaacs și Lindenmann (1952) cu ocazia studiului fenomenului de interferență descris de Magrassi și Koskins (1935) în care infecția unei celule cu un virus *(virus inductor sau interferent)* blochează creșterea în aceeași celulă a unui al doilea virus *(virus revelator al interferenței)* (fig. 71). Descoperit datorită acțiunii sale antivirale, interferonul

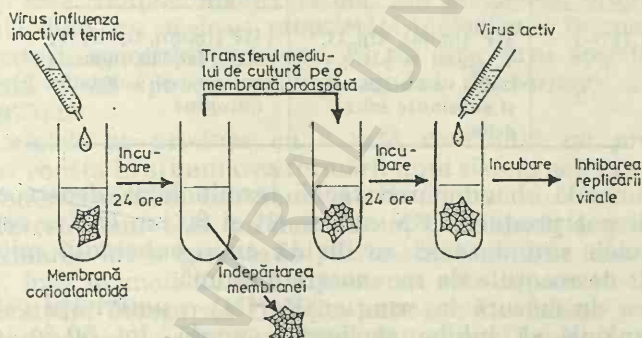


Fig. 71. — Schema experienței lui Isaacs și Lindenmann de descoperire a interferonului (după Stewart II 1979).

poate fi definit în prezent ca un grup de proteine antivirale dotate, deopotrivă, cu multe alte proprietăți biologice, în special anticelulare, antitumorale și imunomodulatoare (J. De Maeyer-Guignard, 1978).

Interferonul este de natură glicoproteică, conținînd lanțuri polizaharidice cu acizi sialici terminali și are g.m. variabilă (15 000–100 000 dal) în funcție de proveniența celulei producătoare. Interferonul uman are g.m. 21 000 dal.

Interferonii elaborați de diferite celule sau specii prezintă anumite deosebiri legate de secvența aminoacizilor în componenta polipeptidică, în conținutul glucidic sau de natură încă nedefinită, deoarece pînă în prezent interferonul nu a fost complet purificat. Celulele nu produc interferon în mod spontan, dar au în schimb capacitatea de a răspunde la o serie de stimuli inductori.

Nomenclatură şi clasificare

Abrevierea internaţională recomandată pentru substanţele din categoria interferonilor este *IFN*, iar identitatea lor este precizată după animalul de origine: *Hu IFN* (uman), *Mu* (şoarece), *Bov* (bovine), *Rat* (şobolan) etc. (tabelul nr. 7).

Tabelul nr. 7

Clasificarea interferonilor pe baza specificităţii antigenice şi echivalentele cu terminologia clasică

Nomenclatura nouă	Nomenclatura veche	
	Om	Şoarece
IFN-α	Le (leucocitar), tip I, stabil la pH 2	F (fast = rapid), C, tip I, stabil la pH 2
IFN-β	F (fibroblast), Fi, tip I, stabil la pH 2	S (slow = lent), A, B, tip I, stabil la pH 2
IFN-γ	IIF (imun), tip II, T, stabil la pH 2, indus de antigene şi substanţe mitogene	IIF (imun), tip II, T, stabil la pH2, indus de antigene şi substanţe mitogene

Se recomandă abandonarea vechii terminologii, deoarece leucocitele şi fibroblaştii pot produce IFN atît α, cît şi β, iar IFN-γ este indus în celulele limfoide stimulate să se dividă cu o substanţă mitogenă, mai degrabă decît de reacţiile de recunoaştere imună.

Unitatea de măsură internaţională (UI) a activităţii este egală cu cantitatea capabilă să inhibe replicarea virală în 50 % din celule. Unii agenţi inductori îşi exprimă această capacitate atît în organism, cît şi în culturi de diferite celule *in vitro* şi produc o cantitate mare de interferon (> 1 000 unităţi/ml). La această categorie intră ARN d.c., virusurile animale ARN, virusurile plantelor şi bacteriofagii, moleculele de ARN d.c. sintetice etc.

Alţi agenţi şi substanţe inductoare, de exemplu, microorganismele parazite intracelulare (bacteriile *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*), unele protozoare, produşii bacterieni de tipul lipopolizaharidelor şi endotoxinelor, polimerii sintetici (acidul poliacrilic sau polivinil) şi unele substanţe cu g.m. mică (de tipul kanamicinei, cicloheximidei şi coloranţilor bazici) sînt relativ inactive în culturi celulare, dar pot declanşa producerea de interferon, după administrarea orală sau parenterală în organism.

Capacitatea de a produce interferon este o proprietate generală a tuturor tipurilor de celule provenite de la vertebrate. O caracteristică deosebit de interesantă au limfocitele, care, ca şi celelalte tipuri de celule, pot fi stimulate de virusuri pentru a produce *interferon viral*. Ele

au însă, în plus, proprietatea unică de a răspunde prin producerea de *interferon imun* atunci cînd sînt expuse la acţiunea unor agenţi inductori, care produc imunocite activate şi inducţie imună. În această categorie intră diferitele antigene specifice care pot fi recunoscute de limfocite în culturi de celule şi în organismul animal *(inducţie specific imună)* şi substanţele mitogene (care stimulează diviziunea), ca, de ex., fitohemaglutininele, concanavalina A etc. În aceste condiţii, limfocitele activate eliberează o categorie de mediatori chimici numiţi *limfokine*, din care face parte şi interferonul. Producţia de interferon imun este mărită în prezenţa macrofagelor.

Interferonul imun diferă fizico-chimic de interferonul clasic viral, dar modul de acţiune pare să fie similar sau identic (Cantell, 1978).

Modul de formare a interferonului

Interferonul este un produs al genomului celular, nu al genomului viral. Dovada este furnizată de faptul că acţiunea sa este maximă pentru sistemul celular în care a fost produs şi însoţită de obicei de un grad de protecţie încrucişată între specii strîns înrudite. Interferonul produs de celulele de şoarece păstrează numai 5% din activitatea sa protectoare la şobolan şi este complet inactiv la om. De asemenea, interferonul produs de o celulă dată are aceleaşi proprietăţi biologice şi fizicochimice, indiferent de natura agentului inductor. El nu este virus specific.

Există două ipoteze privind modul de formare a interferonului (Riley, 1975):

1) Celulele ar produce cu o rată constantă un *prointerferon*, iar inducţia ar consta în stimularea formării unui sistem activator care converteşte prointerferonul în interferon activ.

2) Interferonul este produs *de novo*. Informaţia genetică necesară pentru formarea lui se găseşte în patrimoniul ereditar al celulelor oricărui vertebrat, însă în mod normal sinteza sa este represată. Inducţia acţionează producînd derepresia funcţiei unor gene celulare.

Experimental s-a demonstrat că inductorul molecular al sintezei de interferon este reprezentat totdeauna în cazul virusurilor de o moleculă de ARN d.c. şi helical, avînd o g.m. foarte mică. În cazul virusurilor cu genom ARN d.c. inductorul este însuşi genomul viral. În cazul virusurilor cu genom ARN m.c. inductorul este forma lor replicativă, iar în cazul virusurilor ADN este un ARN d.c. format prin replicarea ARNm viral.

În cazul infecţiei celulelor cu picornavirusuri inducţia sintezei de interferon are loc după schema următoare: a) infecţia celulară este urmată de decapsidare şi eliberarea genomului ARN în celulă; b) sinteza de ADN-polimerază virală are ca urmare formarea de ARN complementar, (ARNc « — »), replica negativă a genomului (ARN« + »); c) cele două catene dau naştere unei molecule de ARN d.c. (ARN « + » ARN « — ») care serveşte atît pentru replicarea virusului, cît şi pentru producerea de interferon. În cazul replicării virale, ARN « — » este utilizat ca model pentru sinteza de ARN complementar (ARN « + » sau ARNm) a cărui informaţie genetică este tradusă în formarea de proteine virale (capsomere), utilizate pentru asamblarea virionilor progeni.

În cursul producerii de interferon, ARN d.c. acţionează ca inductor asupra genelor din nucleul celular, care poartă informaţia genetică pentru sinteza de interferon, determinînd suprimarea represiei lor (informaţia genetică ADN este transcrisă la ARNm şi tradusă în proteina-interferon). Nu se ştie exact dacă inductorul acţionează ca simplu semnal, prin intermediul membranei celulare, sau dacă trebuie să pătrundă chiar în nucleul celular pentru a declanşa sinteza de interferon (De Maeyer, 1971).

Este evident însă că semnalul pentru inducţia de interferon viral este ARN d.c., moleculă care neutralizează printr-un mecanism necunoscut represorul specific al sintezei de interferon. Factorul determinant al inducţiei este structura bicatenară însăşi a moleculei de ARN şi nu informaţia genetică inclusă în structura sa. Moleculele de ARN d.c. normale, active şi infecţioase îşi pierd infecţiozitatea în urma mutaţiilor produse de iradierea cu raze UV (alterare la nivelul secvenţelor de baze), dar păstrează nealterată capacitatea de a induce sinteza de interferon (Falcoff, 1978).

Activitatea inductorilor nevirali toxici (endotoxine) sau chimici se exercită prin intermediul efectului lor citotoxic, care favorizează distrugerea celulelor gazdei şi eliberarea de ARN d.c., iar aceea a polizaharidelor şi polimerilor anionici prin imitarea structurii repetitive şi a comportării ionice a ARN d.c. (Cantell, 1977). Mecanismul de producere a interferonului imunologic, care este produs în cursul stimulării limfocitelor de diferite substanţe, este complet necunoscut.

Producţia de interferon uman necesită participarea a cel puţin doi determinanţi genetici, situaţi pe cromosomii 2 şi 5 (Tan şi colab., 1974) şi anume: unul reprezentînd gena structurală pentru interferon, iar cel

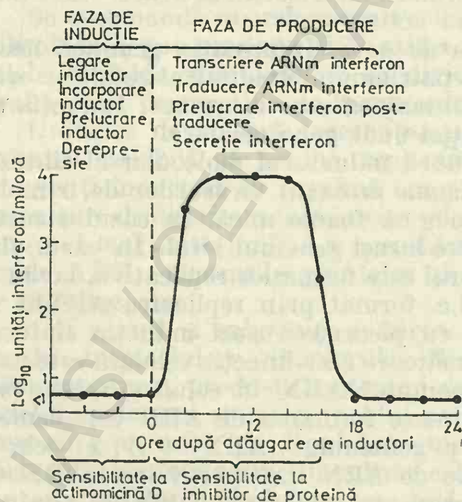


Fig. 72. — Dinamica producerii interferonului în celulele L929 de şoarece după inducţia cu virusul bolii Newcastle (după Stewart II şi Gosser, 1971).

de-al doilea gena pentru receptorul de inductor sau pentru o proteină cu funcţie necunoscută, dar esenţială pentru inductor. Biosinteza de interferon începe *in vivo* la cîteva ore de la inducţie şi are loc la nivelul

polisomilor legaţi de membrane. Inducţia acţionează prin derepresia mai multor gene celulare ($\sim$12 gene în cazul IFN-α), transcrierea, apoi traducerea ARNm respectiv la nivelul reticulului endoplasmic. Celula excretă moleculele de interferon rapid atît timp cît acesta persistă în veziculele reticulului endoplasmic. Sinteza de interferon durează puţin (18—20 de ore) şi este urmată de o fază refractară, în cursul căreia celulele sînt incapabile să mai producă interferon (fig. 72). Paralel cu sinteza de IFN celulele respective produc alte 23 tipuri de proteine noi, al căror rol nu este încă cunoscut (Meurs, 1980; Raj şi Pith, 1980).

Bazele moleculare ale activităţii interferonului

Interferonul nu are o activitate antivirală directă, nu este un efector, ci un inductor al acestei proprietăţi (Joklik, 1977). El acţionează asupra celulelor încă neinfectate în care induce o stare de rezistenţă faţă de infecţia virală, influenţînd multiplicarea virusurilor la nivele foarte diferite (decapsidare, transcrierea genomului viral, sinteza proteinelor virale, evenimentele terminale ale replicării), după natura sistemului celular studiat.

După eliberarea din celulele în care a fost sintetizat, interferonul este legat de un receptor situat pe suprafaţa membranei celulare, reprezentat de resturile poliozidice ale gangliozidelor membranare şi de un complex glicoproteic. Constituenţii prezenţi în cele două situsuri de fixare şi activare cooperează pentru a produce modificări ale suprafeţei celulei, declanşînd în aceasta un lanţ de sinteze care determină modularea necesară atît pentru inducţie, cît şi pentru menţinerea stării antivirale (Chany, 1978). Acţiunea antivirală este mediată de a doua proteină, indusă de interferon, care în ciuda unui efort considerabil nu a fost încă izolată, probabil datorită faptului că este legată de ribosomi (Cantell, 1978).

Sensibilitatea la interferon este dependentă la om de activitatea unor gene localizate pe cromosomul 21*), care controlează sinteza unui receptor de interferon pe suprafaţa celulară (fig. 73). Fixarea necesită prezenţa nespecifică a unor gangliozide. IFN se leagă iniţial de un lipopoliozid membranar, după care interacţionează cu receptorul specific. Ca urmare, interferonul nu pătrunde în celulă (este activ chiar dacă este legat de un suport solid care-l menţine extracelular) şi astfel fixat induce sinteza unui ARNm nou, care este apoi tradus la o proteină nouă efectoare „proteina inhibitoare" a transcrierii şi/sau a traducerii mesajului genetic viral (PIT) care interferă, după cum arată numele, fie cu sinteza de ARNm, fie cu sinteza de proteine, fie cu ambele. Acest proces dispune de un mecanism de amplificare, prin care o singură moleculă de interferon poate induce sinteza unei mari cantităţi de PIT. Ansamblul interferon—proteină antivirală PIT formează sistemul interferon (Baron, 1970).

În sistemele celulare tratate cu interferon („interferonate", Falcoff, 1979), acesta creează un mecanism dublu de rezistenţă antivirală (Kerr,

---

*) Celulele bolnavilor de mongolism care au trei cromosomi 21 (trisomie 21) sînt mai sensibile la acţiunea antivirală a interferonului decît celulele normale care au doi cromosomi 21.

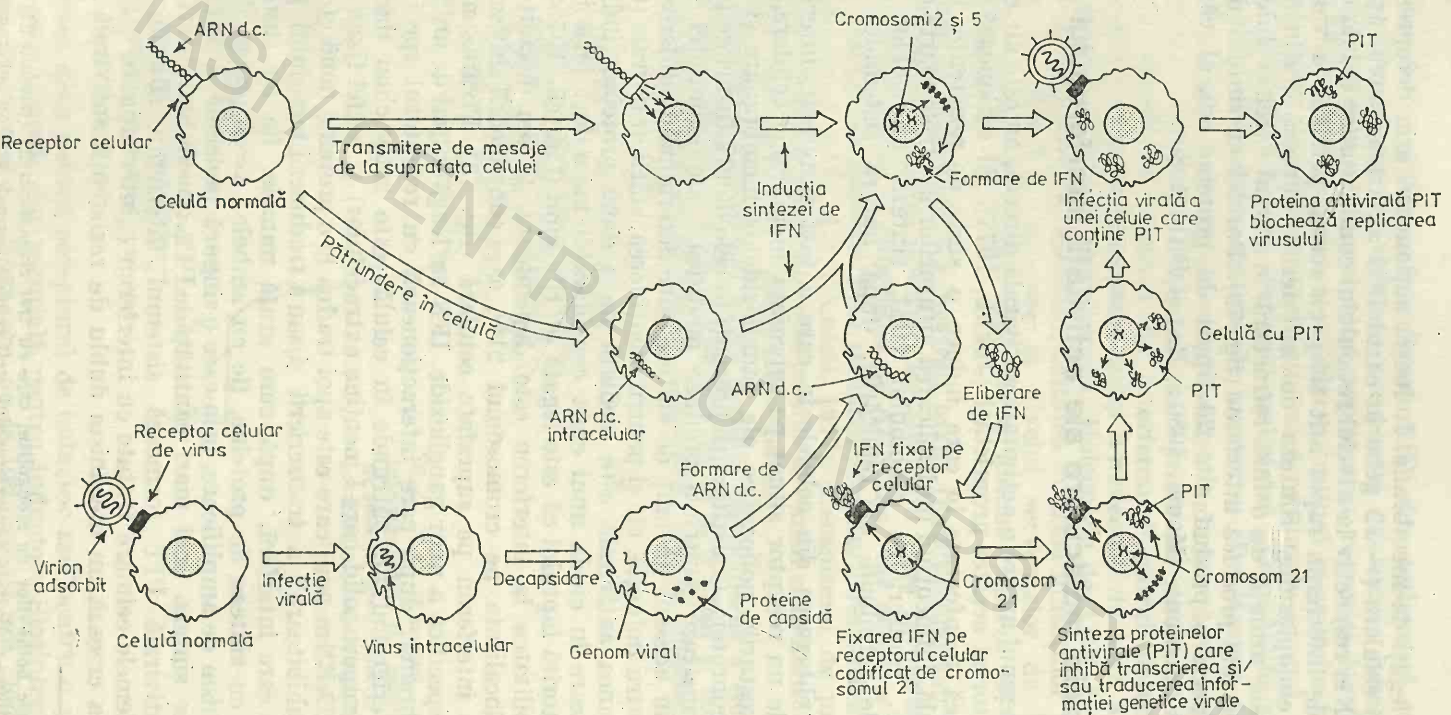


Fig. 73. — Inducția și modul de acțiune a interferonului după ipoteza proteinelor antivirale, care inhibă transcrierea și/sau traducerea genomului viral.

1974): 1) Interferonul induce apariţia unor activităţi enzimatice nucleazice noi, care au ca efect distrugerea ARNm virali pe măsură ce aceştia apar. Cele cîteva molecule de ARNm viral, care eventual „scapă" de distrugerea prin nucleaze, sînt ineficiente deoarece nu se pot lega de ribosomi; 2) Mecanismul antiviral „de siguranţă" inhibă formarea „complexului de iniţiere", respectiv asamblarea acelor molecule care dau semnalul de debut al sintezei proteinelor. IFN induce, paralel cu dezvoltarea stării antivirale, sinteza a două enzime a căror activitate este dependentă de prezenţa ARN d.c. şi de ATP, şi anume proteinkinaza şi 2-5A-sintetaza. Rolul lor în mecanismul de acţiune al IFN nu este clarificat, dar este cert că activitatea antivirală urmează cinetica de inducţie a acestor enzime (Ball, 1979).

2-5A-sintetaza determină sinteza unui inhibitor al biosintezei proteinelor cu g.m. mică, numit simplificat 2-5A, care este constituit în realitate dintr-o serie de molecule mici de acizi oligoadenilic trifosfat, cu formula generală pppA (2'p5A)n, în care *n* variază de la 1 la 10. Dovadă că acţiunea antivirală a IFN este foarte complexă şi se realizează prin mecanisme diferite este demonstrat şi de faptul că rolul 2-5A-sintetazei şi al proteinkinazei este primordial în anumite tipuri de celule şi accesoriu în altele.

Interferonul nu influenţează mecanismele normale celulare de formare de ARNm şi de proteine datorită, probabil, faptului că, în general, sinteza de ARN virală are loc în situsuri (compartimente) celulare bine localizate şi că activitatea nucleazică este şi ea probabil compartimentată şi concentrată în acele locuri în care se găsesc mesagerii virali (Falcoff, 1979).

În extractele celulare tratate cu interferon s-au observat o degradare şi inactivare a unor molecule de ARNt care s-ar putea produce şi *in vivo*.

Efectele biologice ale interferonului

După datele actuale, interferonul exercită o serie de acţiuni asupra organismului în care s-a format sau în care este introdus. Aceste efecte sînt, în mod evident, numai parţial cunoscute, iar mecanismele moleculare prin care se exercită sînt în cea mai mare parte încă neelucidate.

1) *Efectele inhibitorii* influenţează: a) multiplicarea virusurilor; b) creşterea intracelulară a altor microorganisme; c) creşterea şi multiplicarea celulelor; d) producerea de anticorpi şi e) apariţia reacţiilor de hipersensibilitate întîrziată. Aceste efecte au o cinetică lentă şi devin evidente după cîteva ore de la tratarea cu interferon, deoarece sînt condiţionate de sinteza unor proteine noi (PIT etc.).

2) *Efectele activatoare* au acţiune asupra: a) exprimării unor antigene la suprafaţa celulelor; b) citotoxicităţii limfocitelor; c) fagocitozei. Ele au cinetică rapidă şi sînt evidente după cîteva minute, deoarece acţiunea lor se realizează prin modificări ale membranei celulare care modifică rapid exprimarea diferitelor funcţii (Cantell, 1978; Falcoff, 1979).

Interferonul este un agent antiviral care face parte din prima linie de apărare naturală a celulei animale faţă de virusuri, deoarece el apare cel mai precoce dintre toate sistemele de apărare ale gazdei (poate fi

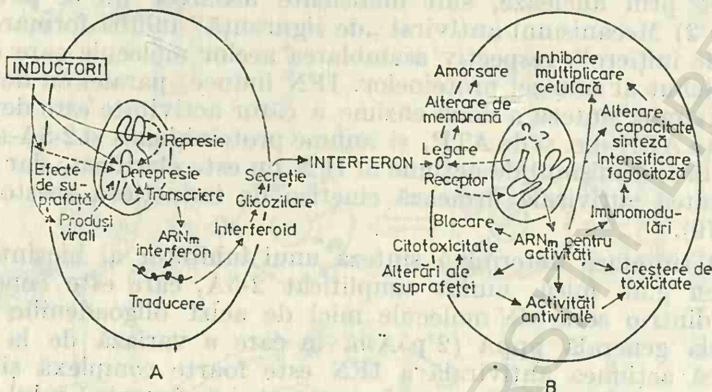


Fig. 74. — Reprezentarea schematică a mecanismelor şi etapelor la nivel celular care duc la sinteza de interferon. Modificările determinate de interferon sînt ilustrate în două celule adiacente, corespunzînd celei în care are loc inducţia sintezei (A) şi celei asupra căreia îşi exercită efectul interferonul produs (B) (după Stewart II, 1979).

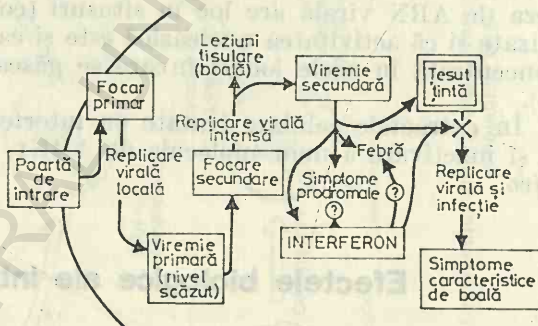


Fig. 75. — Implicaţiile posibile ale interferonilor în infecţiile virale generalizate (după Stewart II, 1979).

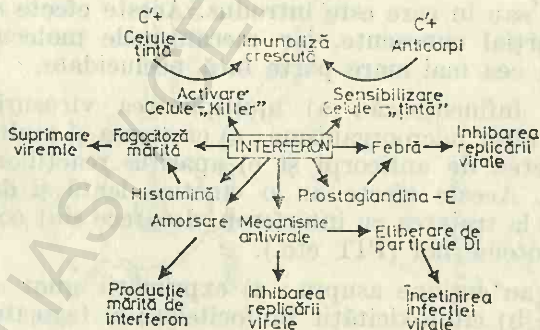


Fig. 76. — Implicaţiile interferonilor în mecanismele de apărare a organismului faţă de infecţiile virale (după Stewart II, 1979).

detectat la cîteva ore de la infecţie). Acţiunea sa protectoare se exercită cu predilecţie asupra celulelor adiacente celulei care l-a produs şi este mai slabă faţă de celulele mai îndepărtate. Toate virusurile animale studiate

s-au dovedit sensibile la acţiunea interferonului, deşi sensibilitatea lor poate varia mult. El are o acţiune preventivă foarte puternică, manifestată în special cînd este administrat înainte de inocularea virusului. În cazurile tratate tardiv boala evoluează atenuat (fig. 75, 76). Interferonul acţionează cel mai bine în celulele aceleiaşi specii de la care a derivat, dar există şi numeroase excepţii de la această regulă. Spre exemplu, interferonul leucocitar uman are activitate antivirală în celulele de maimuţă, porc, iepure, pisică, cobai. El protejează celulele bovine mai bine decît pe cele umane şi chiar mai bine decît propriul lor interferon bovin (Gresser, 1974; Joklik, 1977). În celulele umane sînt activi numai interferonii bovini şi umani.

Interferonul inhibă multiplicarea celulelor normale şi tumorale prin lungirea duratei de generaţie şi are un efect manifest antitumoral *in vivo*. Efectul antitumoral se realizează şi prin producerea unor modificări importante ale membranei celulare, care permit o recunoaştere mai rapidă a celulelor tumorale — ca structuri „străine" („nonself") de către sistemele de apărare ale organismului (Gresser, 1972, 1977). El măreşte acţiunea fagocitară a celulelor sistemului fagocitar mononuclear (macrofage) şi efectul de citotoxicitate limfocitară, intensificînd în special acţiunea limfocitelor NK*) faţă de celulele tumorale ţintă.

Interferonul are un efect general de reglator al răspunsului imun *(rol imunomodulator)* prin faptul că în unele sisteme favorizează *imunocompetenţa*, în timp ce în altele are un efect *imunodepresor* sau chiar *imunosupresor* (de Maeyer, 1975, 1979). IFN este produs probabil şi în condiţii fiziologice (nu numai acut, indus de virusuri) cu rolul de substanţă reglatoare locală, în cel puţin trei arii anatomice: tractul orogastrointestinal, rinofaringe şi bronhii şi în celulele sistemului imun central şi periferic. În felul acesta, acţiunea antivirală a interferonului apare doar ca una din manifestările efectelor sale generale asupra celulei.

Interferonul este una din proteinele cele mai active la nivel biologic: acţiunea antivirală este obţinută *in vitro* la o concentraţie de 10^{-15} M, iar efectele imunomodulatoare *in vivo* sînt demonstrabile în doze de $\sim$10 nanograme/g animal.

Utilizarea în practică în tratamentul unor boli virale grave (rabie, hepatite, herpes ocular, boli tumorale: osteosarcom, mielom, neoplasm pulmonar etc.) se loveşte de dificultăţile mari legate de obţinerea cantităţilor mari**) necesare pentru un tratament eficient şi de purificarea lui. În prezent, principalele surse de IFN sînt leucocitele normale şi liniile celulare stabilizate de origine umană, în particular fibroblaşti, celule limfoblastoide infectate cu virusul Sendaï, precum şi linia de limfom Burkitt-Namalva, însă producerea este complicată şi foarte costisitoare (Cantell, 1978; Falcoff, 1979).

---

*) Limfocitele NK (engl. *natural Killer* — „ucigaşi naturali") reprezintă celule specializate în rezistenţa spontană a organismului faţă de tumori (Peter, 1975).

**) Doza terapeutică antitumorală la om este apreciată la 300 milioane unităţi pe an. „Unitatea de interferon" reprezintă cantitatea de interferon care protejează 50 % din celulele expuse faţă de infecţia cu un virus dat.

Se apreciază că obținerea interferonului în cantități mari va fi realizată în viitorul apropiat pe două căi:

1) Prin producerea lui de bacteria *E. coli* la care s-au transferat genele care codifică sinteza interferonului în celule umane prin tehnici de inginerie genetică. Recent, Nagata (1980) a reușit să cloneze în *E. coli* o moleculă de ADN complementar de IFN uman și să obțină producerea de polipeptide cu activitate de IFN leucocitar uman ($\sim 5 \times 10^8$ u.i/l cultură, respectiv cca 100 000 molecule/celulă).

2) Prin degradarea moleculei de interferon și stabilirea porțiunii sale minime active, urmată de determinarea secvenței sale de aminoacizi și producerea unui „miniinterferon" activ, pe cale de sinteză chimică (Cantell, 1978).

*

Originea și evoluția sistemului interferon. Mecanismele de protecție induse de interferon au fost descrise pînă în prezent la pești, reptile, păsări și mamifere. Mecanisme analoge au fost descrise la unele plante și la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, după expunere la un fag inactivat (Mercer, 1981).

În măsura în care mecanismele antivirale descrise la bacterii și la plante sînt în esență similare celor descrise la om, aceasta ar fi o probă a unei origini foarte vechi a sistemului, care ar îndeplini normal funcția de reglator al diferitelor funcții celulare — activitatea antivirală fiind numai una dintre aceste funcții (Baron, 1970).

Oncogeneza virală

(Pl. 20–23)

Ipoteza originii infecţioase a unor tumori este foarte veche (Metchnikoff şi Borrel, 1903), iar capacitatea anumitor virusuri de a induce formarea de tumori în condiţii naturale şi experimentele a fost evidenţiată în anul 1908, de către Ellerman şi Bang, care au demonstrat că leucemia găinilor poate fi transmisă prin filtrate acelulare. Rous (1911) a demonstrat natura virală a sarcomului muşchiului pectoral la găină *(sarcomul Rous)*. Ulterior au fost izolate numeroase virusuri tumorigene pentru broască, şoarece, cobai, iepure, pisică, cîine şi maimuţe. În anul 1950, Burkitt a descris prima tumoră umană *(limfomul Burkitt)*, a cărei origine virală a fost demonstrată de Epstein şi Barr (1964).

Transformarea malignă. Celula tumorală

Transformarea malignă este o modificare indusă, ereditară, a proprietăţilor unei celule, însoţită de pierderea controlului reglator al creşterii sale (Butel şi Melnick, 1972). Cînd nu există un inductor aparent (virus, substanţe chimice, agenţi fizici) transformarea este numită „spontană".

Celula tumorală este o celulă care a „pierdut conştiinţa prezenţei vecinelor sale" (Denoix, 1977). Ea încetează să le perceapă şi să-şi menţină ritmul de multiplicare corelat cu ritmul celorlalte, pentru a menţine armonia ţesuturilor, forma organelor şi eficacitatea funcţiilor. Devenită „asocială" şi anarhică, celula tumorală se multiplică mult mai rapid decît celulele înconjurătoare, iar descendenţii ei se infiltrează în ţesuturile înconjurătoare şi sfîrşesc prin a distruge arhitectura normală a organului din care făceau parte.

Celula tumorală este o expresie fenotipică a unor tulburări ale sistemelor de reglare, ale diviziunii celulare şi homeostaziei, cu etiologie şi patogenie diferite.

Proprietăţile celulelor transformate de virusuri. Transformarea celulelor animale în culturi sub acţiunea virusurilor oncogene determină un larg spectru de modificări privind forma, activitatea biochimică şi com-

portamentul celulelor respective. Fenomenologia transformării *in vitro* este bazată pe studii legate de infectarea celulelor de şoarece, hamster şi maimuţă cu virusurile SV40 şi poliom şi de infectarea celulelor de pui de găină, şoarece şi şobolan cu oncornavirusuri (virusul sarcomului Rous, al sarcomului murin şi al leucozei murine).

Celula transformată de virusuri pierde multe din restricţiile la care sînt supuse celulele normale. Spre exemplu, diviziunea celulară nu mai este riguros reglată de contactul celulă — celulă sau de factorii specifici din ser, iar recunoaşterea celulei de către celulele învecinate nu mai determină menţinerea poziţiei lor normale. Diferenţele dintre celulele normale şi cele transformate sînt cunoscute foarte detaliat, cu particularităţile lor, variabile după natura virusului oncogen şi a celulei respective, dar mecanismele de apariţie ale acestor modificări şi de menţinere a unora sau a tuturor sînt încă necunoscute. Nu există un criteriu unic care să deosebească specific şi universal celulele transformate de cele normale.

Celula tumorală diferă de celula normală printr-o gamă largă de caractere, care nu sînt toate cumulate în mod obligatoriu într-o anumită celulă transformată, dar este evident că cel puţin jumătate din diferenţele dintre ele sînt asociate fie direct, fie indirect cu modificări în suprafaţa membranei celulare.

Modificări morfologice. Celulele transformate prezintă o morfologie alterată (variabilă după tipul celulei normale din care provin), adesea specifică după natura virusului transformant. Ele sînt mai mici, refringente, rotunjite, fusiforme sau cu aspect foarte alungit, cu nuclei anormali şi cu modificări ale motilităţii celulare.

Modificările genetice se referă la o instabilitate genetică pronunţată (Cuzin, 1979), manifestată prin modificări cromosomale variabile după natura virusului şi a celulei (ruperi de cromosomi, aneuploidie, anomalii ale mitozei etc.).

Modificările suprafeţei celulare includ: — modificări complexe în compoziţia chimică a glicolipidelor şi glicoproteinelor de membrană; — producerea în exces de mucopolizaharide, dispuse într-un strat gros pericelular, datorită sintezei crescute a acidhialuronicsintetazei; — prezenţa antigenelor de suprafaţă specificate de virus; — creşterea ratei de transport a unor nutrienţi (în special zaharuri); — creşterea aglutinabilităţii prin lectine vegetale*).

Modificări metabolice şi fiziologice. Celula transformată prezintă o stimulare a sintezei ADN (pînă la 10 ori mai mare decît celula normală). Glicoliza anaerobă este crescută. Producerea de acid lactic este mult mărită comparativ cu celulele normale, care cresc cu aceeaşi rapiditate şi la aceeaşi densitate.

Celulele transformate pot îndeplini aceleaşi activităţi fiziologice ca şi celula normală din care provin, deşi cel mai frecvent lucrează rău sau deloc. În unele cazuri, celulele transformate prezintă activităţi de tipul

---

*) Lectinele sînt proteine neenzimatice cu proprietăţi specifice de legare a carbohidraţilor, utilizabile pentru cercetarea suprafeţelor celulare şi a modificărilor produse de dezvoltare sau de transformare. Cele mai frecvent folosite sînt concanavalina A izolată din *Canavalia ensiformis* şi lectina din germeni de grîu (*Triticum vulgare*).

„uzurpărilor de identitate" (Mathé, 1977), ca în cazul unei celule pulmonare care poate produce hormon hipofizar corticotrop, prin derepresia anormală a unor gene nefuncționale.

Modificări ale caracterelor de creștere și multiplicare. Creșterea și multiplicarea celulelor transformate este marcată de lipsa răspunsului la mecanismele normale de control ale creșterii celulare.

Spre deosebire de celulele normale care se multiplică în mod coordonat — în funcție de necesitățile organismului — sub controlul unor stimuli naturali, celulele transformate se multiplică anarhic, neîntrerupt, prin diviziuni mult mai frecvente decît este normal și independent de stimulii naturali. Ele sînt în mică măsură supuse dispozitivelor normale de control, care „spun" unei celule cînd să se dividă. Celulele normale au afinitate mare pentru suprafețele solide — se fixează pe sticlă — și se divid regulat atît timp cît cultura dispune de spațiul necesar pentru extinderea ei în suprafață. Cînd se formează un strat monocelular în care elementele sînt aproape confluente, diviziunea celulară se oprește datorită fenomenului de „inhibiție de contact" (Abercrombie și Heaysman, 1953). Pierderea inhibiției de contact, datorită unor mecanisme moleculare complexe — încă incomplet elucidate — are drept consecință absența orientării ordonate a celulelor în culturi, creșterea lor în formă de colonii dense, compacte, care formează adevărate microtumori.

Rata de creștere și de diviziune a celulelor transformate este în mod obișnuit mărită, iar potențialul lor de menținere în culturi celulare *in vitro* este teoretic nelimitat, spre deosebire de celulele normale care au o viață finită *in vitro*, limitată la $\sim 50(\pm 10)$ generații ca o proprietate intrinsecă a celulei (Hayflick și Moorhead, 1961)*).

Celulele transformate sînt mai ușor de cultivat și cresc chiar la densități foarte mari, spre deosebire de celulele normale care prezintă fenomenul de *inhibare dependentă de densitate* (Stoker și Rubin, 1967), și se dezvoltă chiar și în condiții inhibitorii pentru celulele normale. Nevoile lor de ser sanguin în mediu sînt mult inferioare celor necesare pentru creșterea celulelor normale. Se dezvoltă în suspensie și formează colonii chiar în medii încorporate în agar moale (0,5 %), spre deosebire de celulele normale, care pentru a se divide au nevoie să se lege de o suprafață solidă („multiplicare dependentă de ancorare"). Celulele transformate cresc și în medii cu hidrocarburi cancerigene (benzantren, metilcolantren etc.), toxice pentru celule normale.

Probe pentru prezența virusului în genomul celulelor transformate. 1) Prezența genomului viral integrat sau a unor secvențe nucleotidice provenite din el în ADN celular poate fi demonstrată prin diferite tehnici (de ex., hibridarea cu ADN sau ARN viral radioactiv) (Westphal și Dulbecco, 1965).

În unele celule transformate, genomul viral este prezent în 1—8 copii, integrate individual sau uneori ca entități autonome, similare plasmidelor (Dulbecco, 1979 ; Cuzin, 1979). Gradul de exprimare a genomului

---

*) Celulele tumorale HeLa izolate în anul 1950 sînt menținute și în prezent în foarte multe laboratoare, în timp ce celulele normale izolate de la aceeași persoană au încetat să se multiplice după doi ani, din cauza unor modificări genetice (pierderi de cromosomi, apariția de cromosomi suplimentari etc.).

viral este variabil de la exprimarea totală, cu formare de virioni progeni, pînă la latența completă (absența transcrierii genelor virale la ARNm sau a polipeptidelor codificate de virus).

2) Prezența antigenelor specific virale, evidențiate prin metode serologice (anticorpi imunofluorescenți) sau prin respingerea transplantelor în gazdele imune.

3) Celulele transformate prezintă rezistență crescută la suprainfecția cu virusul omolog, transformant.

4) Evidențierea și eliberarea virusului din celula în care este „mascat" prin formarea de heterocarioni sau cocultivare*).

Acțiunea tumorigenă. Echivalarea transformărilor morfologice, biochimice etc. *in vitro* cu modificările neoplazice *in vivo* se realizează prin demonstrarea capacității celulelor transformate de a iniția producerea de tumori după inoculare la gazdele corespunzătoare. Acțiunea tumorigenă poate fi demonstrată cu o frecvență variabilă după natura virusului, numărul celulelor injectate, țesutul sau locul de inoculare (punga jugală la hamster). etc.

Alte proprietăți ale celulelor transformate. Întrucît celulele maligne proliferează mai mult sau mai puțin fără restricții, introduse *in vivo*, la animale de laborator sensibile, ele sînt capabile de migrare, ducînd la creștere invazivă și metastatică, ceea ce demonstrează scăparea atît de sub controlul creșterii și multiplicării, cît și al celui pozițional.

Desprinderea și difuzarea celulelor tumorale din țesut este facilitată de faptul că ele sînt legate prin forțe de coeziune inferioare celor care unesc celulele normale, de mobilitatea lor amoeboidă mărită (viteza de deplasare depășește de ~100 de ori pe aceea a celulelor normale), iar implantarea este favorizată de pierderea afinității specifice pentru celulele identice.

Virusurile oncogene

Virusurile oncogene au proprietatea de a produce în culturi de celule modificări caracteristice și permanente (care se transmit ereditar de la o celulă la descendenți); celulele transformate, implantate la o gazdă sensibilă, determină apariția unor tumori sau a unor afecțiuni maligne de tipul leucemiilor. Din cele peste 600 de virusuri cunoscute în prezent ~150 sînt considerate ca potențial oncogene.

Ele sînt clasificate în două grupuri, după natura genomului viral:

Grupul virusurilor oncogene cu genom ADN *(Oncodnavirus)* este un grup eterogen care include ~50 entități diferite: *Papilloma-*, *Polyomavirus*, *SV40*, *Adenovirus* tipul 12 (uman), 6 (simian), 2 (aviar și bovin), unele virusuri din grupul *Herpes*, virusul hepatitei B și unele virusuri *Pox*. Virusurile citate nu sînt întotdeauna oncogene.

---

*) Cultivarea explantului de tumoră împreună cu un substrat celular permisiv pentru virusul respectiv.

Ele pot prezenta două tipuri de interacțiuni cu celulele-gazdă: a) *infecția productivă* în cursul căreia se formează sute de mii de particule virale care duc la moartea celulelor infectate și b) *transformarea celulară*, în care virusul nu se replică în celulă, dar celula este modificată morfologic, iar multiplicarea ei și sinteza macromoleculelor sînt controlate în parte de genele virale.

Grupul virusurilor oncogene cu genom ARN (*Oncornavirus*) formează o clasă omogenă (*Thylaxoviridae*), care cuprinde ~100 entități, avînd o serie de caracteristici comune: a) morfologie și structură similare; b) genom ARN m.c. cu mărime comparabilă ($\sim 10 \cdot 10^6$ dal); c) se multi-

Tabelul nr. 8

Principalele virusuri oncogene și tipurile de celule și gazde sensibile (modificat după Feunteun, 1980)

Categoria de virus	Virusul		Gazda naturală	Proveniența celulelor sensibile la transformări în cultură	Gazde la care injecția de virus produce tumori
Oncodnavirus	*Papovavirus*	Poliom	Șoarece	Șoarece, șobolan, hamster	Șoarece, șobolan, hamster
		SV40	Maimuță	Șoarece, șobolan, hamster, om	—
		Papilloma	Om, iepure, bovine	Hamster	Specia de la care provine
	Adenovirus		Om, maimuță, bovine	Hamster, șobolan, iepure	Hamster
	Herpesvirus		Om, pui de găină, broască	Om	Pui de găină, broască
	V. Hepatitei B		Om	?	?
	Poxvirus		Iepure, maimuță	Iepure	Iepure, maimuță
Oncornavirus (Retrovirusuri oncogene)	*Retrovirus* tip C	Sarcom aviar Leucemii aviare	Pui de găină	Pui de găină, rață, șobolan, hamster, șoarece	Pui de găină, rață, hamster, șobolan, șoarece
		Sarcom murin Leucemii murine	Șoarece	Șoarece, hamster, șobolan	Șoarece, șobolan, hamster
		Sarcom și leucemii la diferite specii	Pisică, hamster, bovine	Gazda de la care provine virusul + cîteva alte specii	Gazda de la care provine virusul + cîteva altele

plică în celule fără să le distrugă și transformă malign atît celulele permisive, cît și pe cele nepermisive; d) produc leucemii și sarcoame sau tumori mamare la anumite mamifere, spre deosebire de virusurile ADN care

produc şi tumori epiteliale; e) se pot integra în genomul celulei-gazdă sub formă de ADN, datorită *transcrierii inverse* a genomurilor.

Nomenclatura grupului este încă discutată. Iniţial au fost denumite *leucovirusuri* sau *virusuri Rous*. Ulterior, s-a propus (Temin, 1974) reunirea lor sub denumirea de *ribodezoxivirusuri (RNADNA-virus)*, criticabilă deoarece grupul cuprinde şi virusuri care nu produc boli maligne (*virusul Visna, virusul sinciţial* — „foamyvirus" etc.). După descoperirea transcriptazei inverse şi a modului de replicare printr-un intermediar ADN, Parks (1973) a propus denumirea de *Retravirus* (*re*verse *tra*nscriptase containing"), care a fost preluată şi folosită curent în varianta modificată (incorectă) de *Retrovirus*. Cealaltă denumire utilizată curent, *Oncornavirus*, trebuie limitată exclusiv la virusurile cu potenţial genetic oncogen sigur sau genetic înrudite cu virusurile oncogene.

Pentru ca un virus să fie oncogen, trebuie să îndeplinească trei condiţii:

— să conţină informaţie genetică transformantă *(oncogenă)*, capabilă să perturbe mecanismele de control ale diviziunii celulare;

— să se replice în nucleul celulei-gazdă şi să aibă capacitate de integrare în genomul acesteia, fapt care asigură transmiterea informaţiei oncogene de la o generaţie la alta;

— informaţia oncogenă să fie exprimată în celula-gazdă (tabelul nr. 8).

Mecanismele moleculare ale oncogenezei produse de virusurile ADN

Grupul Papovavirus reuneşte entităţi aparţinînd genurilor *Papilloma-*, *Polyomavirus* şi *SV40*. Cele mai multe date obţinute prin cercetări asupra virusurilor poliomului, numit astfel deoarece produce tumori cu diferite localizări în glandele salivare, ţesutul epitelial sau subcutanat, glanda mamară, os, pulmon, ficat etc., şi SV40 sînt valabile pentru ambele virusuri, atît în ceea ce priveşte aspectul şi construcţia virionului, cît şi comportarea lui în celulă.

Virusul SV40

Este un virus izometric, cu simetrie icozaedrică, avînd ⌀ 45 nm şi g.m. 28×10^6 dal. Genomul viral este format din ADN d.c. circular şi suprahelical, formînd aprox. 500 ture de spiră. Conţine 5 224 de perechi de nucleotide, ceea ce corespunde capacităţii de a codifica 1 741 AA (Nathans, 1979); are g.m. $\sim 3 \cdot 10^6$ dal şi o lungime de 1,6 μm. Genomul viral este legat de 4 din cele 5 histone principale provenite din celula-gazdă (H4, H2a, H2b şi H3) şi încorporate în structura virionului (fig. 77). Analiza genetică a arătat că genomul SV40 este alcătuit din trei gene (cea mai simplă structură genetică descrisă la un virus ADN), corespunzînd proteinei majore a capsidei, proteinei minore şi antigenului T.

Capsida SV40 este alcătuită din 72 de capsomere, corespunzînd la 420 de lanţuri polipeptidice, grupate în hexamere şi pentamere (proteina cu numărul cel mai mare de copii — VP1 are g.m. 47 000 dal). Se adaugă în fiecare virion ~ 40 de copii dintr-un al doilea polipeptid VP2 (g.m. 34 000 dal) ale cărui localizare şi rol sînt necunoscute.

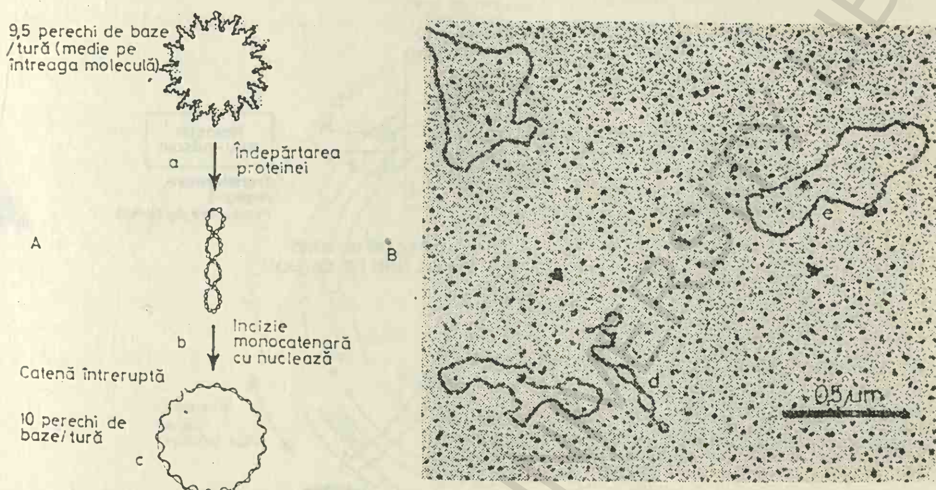


Fig. 77. — Diferitele conformaţii ale ADN SV40. A. a, ADN complexat cu o proteină specifică formează un minicromosom caracterizat prin prezenţa de ,,pachete" repetate de ADN d.c. pliat şi proteine; b, după purificare prin îndepărtarea proteinei, ADN SV40 ia conformaţie superhelicală (forma I), care după secţionare monocatenară cu o nuclează se ,,relaxează", formînd o moleculă de tip II — o catenă circulară şi una lineară (c). B. Microelectronografia unui genom ADN SV40 izolat, evidenţiind forma superhelicală (d) şi circulară relaxată, după apariţia unei breşe monocatenare (e) (după Sharp, 1975).

Virusul SV40 produce un efect vacuolant citoplasmatic în celulele renale de *Cercopithecus aethiops*. Inoculat la hamsterul nou-născut produce tumori cu evoluţie rapidă în diferite organe. Este nepatogen pentru om.

În raport cu răspunsul lor faţă de infecţia cu virusul SV40, celulele animale se împart în două categorii:

— *celule permisive*, care permit multiplicarea virusului şi provin, de regulă, de la animale care în mod normal sînt susceptibile la infecţia cu virusul respectiv. În celulele permisive virusul se replică masiv în nucleu, care ajunge să fie ocupat integral de particulele virale (~ 1 milion), după care se produce dezorganizarea funcţiilor nucleare şi liza celulei;

— *celule nepermisive*, provenind de la animale care nu sînt infectate în mod obişnuit de virusul respectiv. În aceste celule virusul nu produce particule virale progene, dar, în schimb, celula este transformată malign, cu toate consecinţele care decurg din acest proces.

În cazul virusului SV40, singurele celule integral permisive sînt celulele renale de maimuţă (Rapp şi Westmoreland, 1976).

Evoluția infecției cu virusul SV40

Ciclul complet de evoluție a virusului SV40 în celulele-gazdă implică „citirea" integrală a informației genetice virale. Una din „piedicile" cele mai importante în acest proces este ridicată în momentul replicării ADN

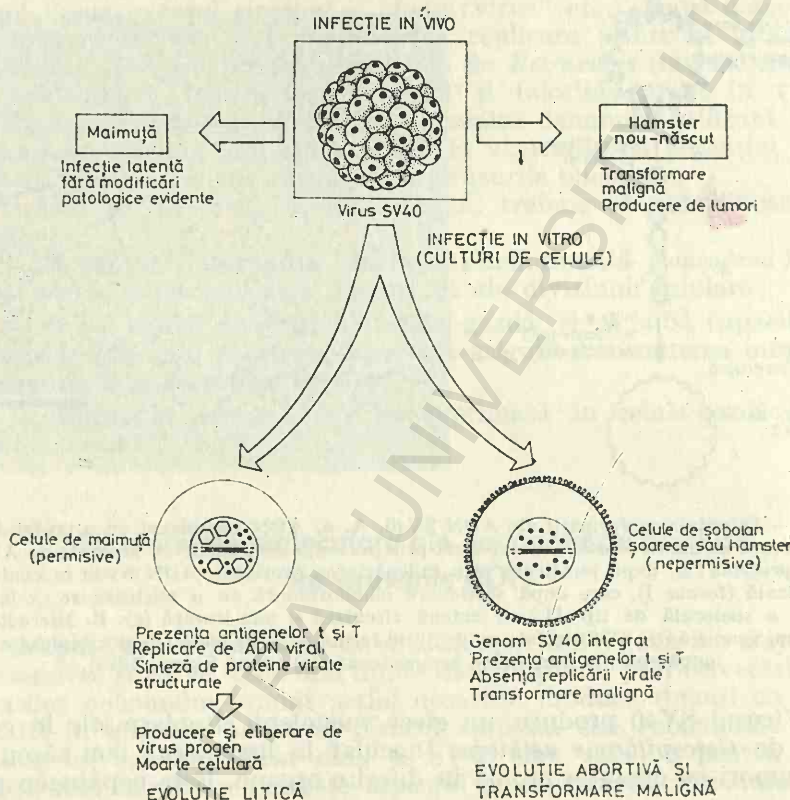


Fig. 78. — Reprezentarea diagramatică a evoluției infecțiilor cu virusul SV40, în funcție de natura celulelor și a organismelor-gazdă.

viral, care separă „programul precoce" destinat să pregătească replicarea ADN (citit înainte de replicarea acestuia) de „programul tardiv" citit ulterior, care asigură sinteza masivă de produși virali și efectele mecanice și toxice care duc ireversibil la moartea celulară.

În celulele permisive, cele două programe sînt citite integral și, ca urmare, infecția virală evoluează citocid, cu producere de virus progen. Celulele nepermisive impun o restricție în citirea programului tardiv, totală sau parțială, în urma căreia infecția este urmată fie de transformarea malignă a celulelor, fie de revenire la normal (infecție abortivă), (fig. 78).

Faza de exprimare a programului precoce durează 10—20 de ore după infecție (Fiers și Weissman, 1978) și ține pînă în momentul replicării ADN viral. În cursul fazei precoce are loc transcrierea unui segment de

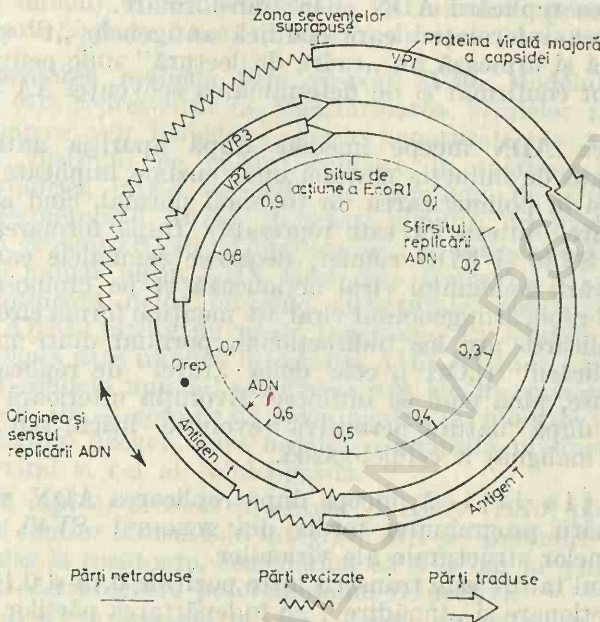


Fig. 79. — Organizarea genomului SV40. Cercul intern (divizat 0-90) reprezintă cele 5 224 perechi de baze ale ADN. Situsul de acțiune al enzimei EcoRI servește drept referință pentru orientarea hărții fizice. Cercurile externe reprezintă diferitele tipuri de ARNm, corespunzînd proteinelor virale precoce (antigenele t și T) și tardive (VP1, VP2 și VP3). Sînt marcate: porțiunile traduse, netraduse și excizate, punctele de inițiere ale replicării ADN, direcția de transcriere a mesajului genetic, precum și secvența de suprapunere a mesajului genetic, (122 de nucleotide din structura ARNm al VP1) folosită și pentru VP2 și VP3. Fragmentele de ARNm separate prin excizie sînt reunite prin „înnădire".

ADN viral între pozițiile 0,65—0,17 din harta genetică (fig. 79). Transcrierea se face după modelul descris la unele genomuri eucariote, în sensul că ARNm care urmează a fi tradus nu este produsul transcrierii unei secvențe continue a ADN. Inițial are loc transcrierea primară la ARN premesager (corespunzînd unei secvențe continue de ADN) care ulterior suferă o maturare, în urma căreia anumite secvențe sînt excizate, iar extremitățile care mărginesc „tăieturile" sînt reasamblate și „înnădite", în așa fel încît ARNm definitiv (matur) este compus prin alipirea unor fragmente de mesaje genetice necontigue.

Produsul transcrierii primare a ADN precoce al SV40 duce la formarea a două molecule de ARNm matur, care dirijează, fiecare, biosinteza unui peptid antigenic „t" și „T".

Antigenul „t” este un polipeptid de 174 AA, avînd în compoziţia sa un număr mare de AA cu sulf (metionină şi cisteină), dar a cărui funcţie specifică nu este cunoscută.

Antigenul „T” este un polipeptid format din 720 AA, bogat în prolină, a cărui funcţie specifică (nedeterminată precis) ar fi de participare la iniţierea replicării ADN şi în transformare.

Traducerea informaţiei care codifică antigenele „t” şi „T” are o origine comună şi urmează un „cadru de lectură” unic pentru ~ 300 de nucleotide, fapt confirmat şi de determinarea secvenţei AA în cele două antigene.

Replicarea ADN începe imediat după apariţia antigenului „T” şi este precedată de inducţia sintezei unor enzime implicate în formarea nucleotidelor şi în polimerizarea lor (în mod normal, cînd aceste enzime nu sînt necesare, sinteza lor este represată). După formarea lor are loc sinteza ADN SV40 şi ADN celular, deoarece semnalele care determină iniţierea replicării genomului viral acţionează şi pe cromosomul gazdei.

În cursul replicării, genomul viral îşi menţine forma circulară închisă covalent. Replicarea are loc bidirecţional, pornind dintr-un punct unic „originea replicării” („Ori”), cele două „furci” de replicare înaintînd în direcţii opuse, pînă cînd se întîlnesc. Evoluţia ulterioară a procesului este diferită după natura permisivă (evoluţie litică) sau nepermisivă (transformare malignă) a celulei-gazdă.

Evoluţia litică începe după replicarea ADN viral şi corespunde exprimării programului tardiv din genomul SV40, care duce la sinteza proteinelor structurale ale virionilor.

Programul tardiv este transcris între poziţiile 0,73 şi 0,17, tot discontinuu (prin secţionare şi „înnădire”, cu îndepărtarea părţilor care nu vor fi traduse) pentru a forma 2 sau 3 tipuri de ARNm matur:

— ARNm 16S care codifică proteina VP1 şi rezultă din eliminarea secvenţelor 0,72—0,95 din harta genetică;

— ARNm 19S reprezentînd probabil două specii de ARNm, care codifică două proteine structurale minore, VP2 şi VP3.

Legat de sinteza acestor proteine sînt de semnalat cîteva particularităţi importante, atît în ceea ce priveşte una din modalităţile prin care virusurile fac economie de material genetic, cît şi asupra structurii şi funcţionării genelor de tip eucariot:

a) ARNm VP2 şi VP3 poartă toată informaţia genetică necesară pentru sinteza polipeptidului VP1, dar această informaţie nu este utilizată;

b) traducerea ARNm VP3 este iniţiată în interiorul genei VP2 şi continuă în „cadrul de lectură” utilizat pentru traducerea acesteia. De aceea, proteina VP3 a fost considerată multă vreme ca un produs de degradare nespecifică a proteinei VP2.

c) ARNm VP1, VP2 şi VP3 au o porţiune comună de 122 de nucleotide, care sînt traduse în două „cadre de lectură” diferite, după modelul descris de Sänger la fagul Φ X 174 (Fiers, 1978). Secvenţa comună de 122 de nucleotide, care codifică trei polipeptide diferite, este integral conservată atît la SV40, cît şi la *Polyomavirus*.

În concluzie, o porțiune mare din genomul SV40 (~1 000 nucleotide) codifică mai mult de o proteină (respectiv „t" și „T"; VP1, VP2 și VP3), iar aproximativ 15,2% din genom nu are rol de codificare a unor proteine.

La sfîrșitul fazei tardive are loc formarea unui număr imens de virioni (~1 milion), funcțiile nucleare sînt alterate progresiv și celula infectată moare *(infecție litică)*. Procesul durează 24—48 de ore la 37°C.

Transformarea malignă prin virusul SV40. Modelul de studiu cel mai adecvat este reprezentat de transformarea celulelor nepermisive de rozătoare (șoarece sau hamster — gazde nenaturale ale virusului), prin însămînțarea virusului pe culturi celulare în monostrat proaspăt, și urmărirea evoluției, într-o perioadă de incubare de cîteva săptămîni (Rapp și Westmoreland, 1976). În aceste condiții, traducerea programului tardiv din genomul SV40 nu mai are loc: se formează ARNm precoce, antigen T și numai puțin ADN viral este transcris la ARNm tardiv, dar nu se formează deloc proteine structurale, pentru că în celulele nepermisive ARNm tardiv nu poate funcționa. În schimb, are loc transformarea malignă care implică integrarea ADN SV40 în cromosomii celulei-gazdă. În celulele umane, integrarea are loc în *cromosomul 7* și *probabil 17* (Croce, 1977), ceea ce ar pleda pentru un mod de integrare similar celui al fagului lizogen, care implică o anumită interacțiune specifică între ADN viral și cel al celulei-gazdă.

Botchan (1976), precum și Ketner și Kelly (1976) pledează pentru existența mai multor situsuri de integrare atît pe genomul viral, cît și pe genomul celular la rozătoare, considerînd că și la om ar putea exista mai multe situsuri de integrare pe cromosomii respectivi.

Genomul SV40 integrat în cromosomul celulei-gazdă se transformă în provirus*) și se stabilește permanent, legat covalent de acesta. Fiecare celulă transformată poate să conțină 1—20 de genomuri SV40, numărul acestora reflectînd, probabil, numărul particulelor virale utilizate pentru transformarea culturii respective. Integrarea genomului SV40 explică persistența stării transformate în clonele celulare derivate din culturile transformate, deoarece provirusul este replicat odată cu ADN celular.

Persistența provirusului SV40 de-a lungul generațiilor, după stabilirea unei clone transformate, pledează împotriva ideii inițiale că virusurile oncogene ar acționa după principiul *„lovește și fugi"* și în favoarea unui rol continuu al funcției genelor virale în determinarea transformării. O dovadă în același sens o furnizează cazurile de *transformare abortivă* în care, după cîteva generații, celulele transformate revin la normal, iar ADN viral dispare din celulă (Berg și Stoker, 1976).

Prezența genomului viral *integral* legat ca provirus de ADN celular este dovedită de faptul că el poate fi recuperat din celule transformate care nu conțin virus infecțios și nici capside virale, prin fuzionarea cu celule permisive neinfectate (heterocarioni). Fuziunea poate fi efectuată prin

---

*) Analizînd relațiile din ecosistemul fag temperat—bacterie lizogenă, Lwoff a sugerat, încă din anul 1953, că transformarea malignă ar putea fi datorită unui proces molecular similar celui care asigură persistența profagului integrat în genomul bacteriei-gazdă, în care o proteină „represor" ar avea un rol esențial.

cultivarea celor două tipuri de celule în comun sau prin tratare cu virus Sendai inactiv.

Citoplasma celulelor permisive facilitează excizia genomului viral, precum și sinteza și traducerea ADN viral printr-un mecanism încă necunoscut. Unele fapte experimentale pledează pentru un mecanism diferit de cel descris la profagul λ lizogen, menținut inactiv prin acțiunea unui represor, care împiedică specific formarea de ARNm precoce și tardiv.

Menținerea integrată a provirusului SV40 pledează pentru un control pozitiv, în care funcțiile tardive virale ar fi sub controlul funcțiilor celulare.

Dealtfel, dacă blocarea transcrierii genelor SV40 tardive s-ar datora unui represor, fuziunea cu o celulă permisivă nu ar duce obligatoriu la eliberarea virusului (inducție), deoarece represorul ar continua să rămînă legat de promotorul genelor SV40 tardive. Este probabil că celula permisivă conține o substanță necesară pentru transcrierea ARNm tardiv.

Transformarea malignă cu virus SV40 nu este o prerogativă exclusivă a celulelor nepermisive. Modificări identice se produc și în unele celule permisive, dar transformarea acestora este numai trecătoare, deoarece toate celulele permisive infectate mor (Dulbecco, 1970).

Transformarea stabilă este un proces relativ ineficient, deși o particulă virală este suficientă pentru a transforma o celulă, iar numărul celulelor transformate este direct proporțional cu cantitatea de virus introdus.

În sistemul SV40 — celule de șoarece 3T3 (care corespunde unor condiții favorabile), din celulele expuse sînt transformate $\sim 40-50\%$ la un raport de 10^3 particule de virus infecțios (respectiv 10^5 particule fizice de virus pentru o unitate de virus transformantă) (Todaro și Green, 1966).

Oncogeneza produsă de alte virusuri cu genom ADN

Virusul Herpes. Virusurile din grupul Herpes pot produce trei tipuri de infecții : infecții productive cu leziuni evidente (de ex., herpesul labial), infecții latente neproductive și în cazul unora dintre ele transformări maligne în cursul cărora genomul viral integrat este numai parțial exprimat.

Virusurile din grupul Herpes sînt implicate în apariția unor boli maligne la animale: boala Lucké (carcinom renal), la broasca *Rana pipiens*, boala lui Marek (limfom contagios), la găini, precum și în unele tumori umane.

Herpesvirus simplex tip 2 este incriminat în etiologia cancerului de col uterin la femei. Unele date indirecte, serologice și epidemiologice, sugerează acest rol, fără a fi însă suficiente pentru stabilirea unei corelații directe între virusuri și tumoră. O dificultate majoră rezultă din răspîndirea ubicvitară a virusului și frecvența infecțiilor latente. Rar izolat de la femei, la care are tendința de a produce infecții de scurtă durată, acute și recurente, cu localizări pe cervix și pereții vaginali, virusul poate fi purtat inaparent și transmis de bărbați, la care a fost evidențiat în canalul deferent și în tumorile de prostată.

Virusul Epstein-Barr (VEB) este incriminat în etiologia limfomului Burkitt și a carcinomului nazofaringian, în anumite regiuni ale globului (fig. 80). În țările cu un nivel de viață ridicat și climat temperat, VEB

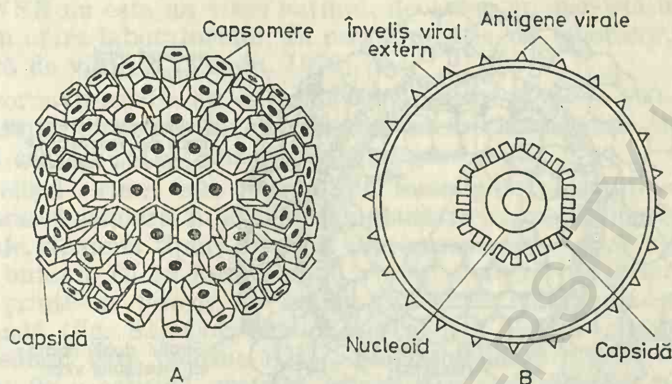


Fig. 80. — Virusul Epstein-Barr — reprezentarea schematică a suprafeței virionului (A) și a constituenților virali pe secțiune transversală (B).

produce o boală acută benignă a sîngelui și a ganglionilor limfatici la copii și adolescenți, *mononucleoza infecțioasă* (W. și G. Henle, 1968). Deoarece în cursul ei sîngele conține celule care se divid, foarte asemănătoare celor din leucemia limfoblastică acută, care cultivate *in vitro* produc virus EB, mononucleoza infecțioasă a fost considerată ca o „boală malignă autovindecabilă" (Rafferty, 1973).

Limfomul Burkitt evoluează sub forma unor tumori ale regiunii maxilare la copiii de 4—8—15 ani. VEB infectează frecvent omul și este purtat în limfocitele umane de majoritatea persoanelor infectate, tot restul vieții, sub formă aparent inofensivă (Rickinson, 1977). Limfocitul B este singura celulă permisivă față de infecția cu VEB, în același timp aptă de transformare malignă (de Thé, 1975; Rafferty, 1973). Potențialul oncogen se exprimă numai la copii din anumite regiuni din Africa tropicală și Noua Guinee, în care factorii climatici permit existența paludismului hiperendemic. Tumora apare la vîrsta la care copiii bolnavi dezvoltă un răspuns imun față de paludism, implicînd proliferarea limfocitelor.

Deși este probabil că stimularea multiplicării limfocitelor creează condiții optime pentru ca virusul să producă transformarea malignă, frecvența relativ mică a cazurilor de limfom, într-o populație în care probabil toți copiii sînt infectați atît cu malarie, cît și cu VEB, s-ar putea explica prin intervenția unor factori genetici. Celulele tumorale poartă mai multe copii (1—10) ale genomului viral integrate sau în stare autonomă (similară plasmidelor) în ADN celular, dar nu conțin particule virale mature. În schimb, liniile celulare stabilizate în culturi, pornind de la celule tumorale, conțin aproape totdeauna 5—20 % celule care produc virus cu morfologie, proteine de capsidă și genom tipic pentru VEB.

VEB este implicat și în etiologia unor forme de cancer nazofaringian la populații din anumite regiuni ale globului (Canton, Maghreb,

Africa de est etc.), la care pe lîngă infecția virală ar interveni o anumită predispoziție genetică, consumul unor anumite substanțe chimice cancerigene etc.

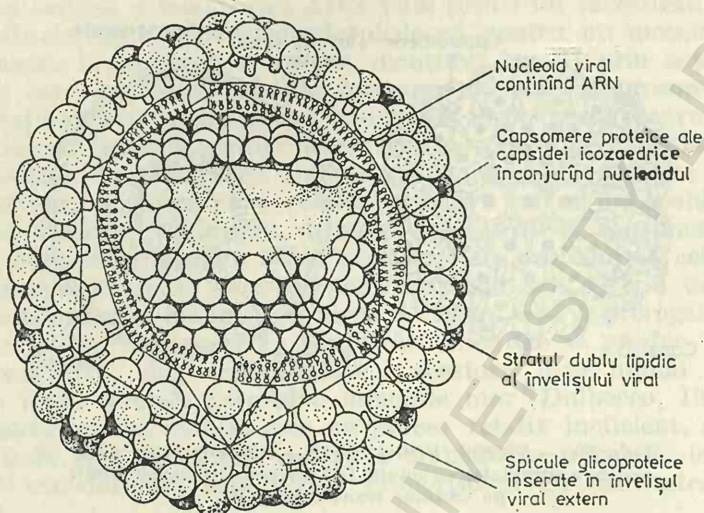


Fig. 81. — Virus tumoral ARN—reprezentare schematică. Parte din capsidă a fost îndepărtată pentru a evidenția structura nucleoidului și așezarea capsomerelor. Spiculele glicoproteice terminale „în buton" sînt inserate printr-un pedicul în suprafața membranei (după Watson, 1977).

Grupul Adenovirus cuprinde trei subgrupuri diferite după compoziția în baze a ADN, coincizînd cu potențialul lor tumorigen: a) G + C 48% (putere transformantă mare); b) G + C 52% (slab oncogene) și c) G + C 58% (neoncogene).

Din cele 31 de serotipuri umane descrise, serotipurile 12, 18 și 31 produc transformarea rapidă și cu frecvență mare a celulelor BHK (celule de rinichi de hamster nou-născut). Celula transformată conține 1—3 genomuri virale.

Virusul hepatitei B transmis prin transfuzie (hepatită de seringă) și pe cale venerică produce la un număr mic din foștii bolnavi infecții cronice, care evoluează la un număr și mai mic dintre aceștia spre un neoplasm hepatic.

Brechot și Tiollais (1980) au demonstrat prezența ADN viral de hepatită B integrat în cromosomii celulelor hepatice tumorale. Se presupune că virusul ar fi un cofactor care acționează asociat cu un factor chimic.

Mecanismele moleculare ale oncogenezei produse de virusurile ARN

Oncornavirusurile au o structură foarte asemănătoare, ceea ce sugerează faptul că, probabil, descind dintr-un strămoș comun. Din punctul de vedere al structurii genetice și al patogenității, ele formează trei grupuri

distincte: virusurile sarcomatogene, care produc tumori ale țesutului conjunctiv la găini, șoarece, pisică și maimuță; virusurile leucemiilor aviare și murine și virusurile intermediare. Cele mai studiate sînt: virusul sarcomului Rous (VSR) și virusurile leucemiei aviare și a șoarecelui. În prezent, VSR nu este un virus natural, deoarece nu persistă în populațiile animale în afara laboratorului. El este o creație de laborator, transferată și păstrată de virologi (Temin, 1976).

Oncornavirusurile au o formă sferică, un ∅ de ~ 100—130 nm și sînt alcătuite dintr-un înveliș extern membranar care înconjură un corpuscul central (∅ ~ 80 nm), care conține ARN.

Învelișul extern este format din fosfolipide obișnuite, componente ale membranei celulare, în care sînt implantate un număr mare de glicoproteine virale, de două tipuri diferite, care proemină pe suprafața virionului ca niște butoni. El se formează în cursul maturării virionului, care se produce printr-un proces de înmugurire prin membrana plasmatică a celulei-gazdă (fig. 82). Corpusculul central este alcătuit dintr-un nucleoid situat median, care conține ARN, asociat cu o proteină virală și este înconjurat de o capsidă proteică icozaedrică alcătuită din ~ 390 capso-

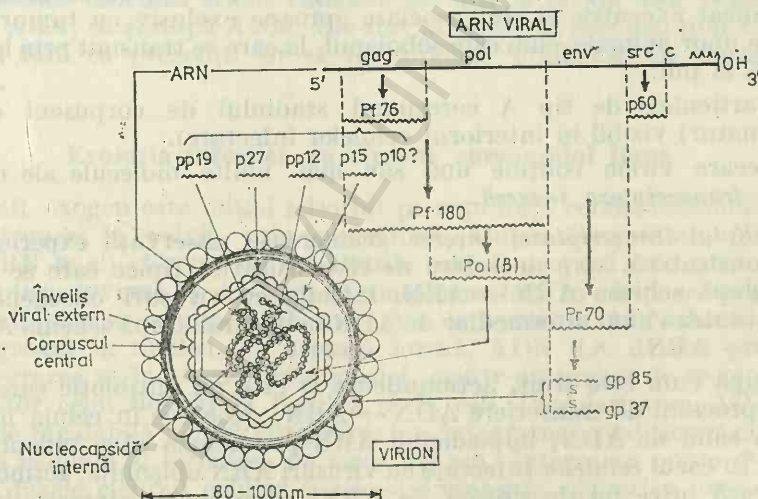


Fig. 82. — Secțiune transversală printr-un *Retrovirus* (virusul mieloblastozei aviare). Cifrele care însoțesc literele *p* (proteină), *gp* (glicoproteină), *pp* (fosfoproteină) sau *Pr* (precursor poliproteic) indică g.m. în Kdal. Proteinele din nucleoid sînt produsul genei *gag*, iar transcriptaza inversă (70 molecule/virion) al genei *pol*. Diferitele proteine virale provin din clivarea proteolitică a unor precursori cu g.m. mai mare sub acțiunea proteazei virale (p15). Spiculele învelișului viral sînt constituite din două glicoproteine (gp 85 și gp 37), provenind din traducerea genei *env*.

mere proteice. Fiecare capsomeră este la rîndul său formată prin agregarea regulată a mai multor polipeptide specifice, de 3—4 tipuri diferite. Nucleoidul este împachetat strîns în capsidă și apare filamentos numai după dezintegrarea blîndă a virionului.

Genomul viral este alcătuit din două molecule de ARN m.c. 35S (~ 10 000 nucleotide) de tip « + », reunite necovalent în apropierea extremității lor 5', pentru a forma un ansamblu de ARN 70S. Cele două „subunități 35S" sînt identice, avînd aceeași secvență de baze. Retrovirusurile sînt deci virusuri diploide (Girard și Hirth, 1980).

Particula virală matură conține numeroase activități enzimatice ca reverstranscriptaza și ribonucleaza H de origine virală, precum și numeroase molecule de enzime (ligaze, kinaze, metilaze, transferaze, nucleaze etc.) și de ARNt, reprezentînd contaminante accidentale provenite din celula-gazdă și încorporate în cursul morfogenezei virale. Cele două subunități genomice (ARN 35S) poartă fiecare în vecinătatea extremității 5', cîte o moleculă de ARNt^{Trp}, care servește ca inițiator pentru sinteza de ADN proviral de către reverstranscriptază.

În funcție de particularitățile lor morfologice*) și morfogenetice există 3 clase de retrovirusuri:

Virusurile de tip C care sînt prevalente, au capacitatea de a induce leucemii, sarcoame și alte forme de neoplazii, la specii foarte diferite, de la reptile pînă la primate.

Virusurile de tip B care diferă de tipul C prin faptul că au nucleoidul localizat excentric și sînt asociate aproape exclusiv cu tumorile mamare ale unor animale, cum este șobolanul, la care se transmit prin lapte de la mamă la pui.

(Particulele de tip A corespund stadiului de corpuscul central (virus imatur) vizibil în interiorul celulelor infectate).

Fiecare virion conține una sau mai multe molecule ale enzimei virale — *transcriptaza inversă*.

Rolul transcriptazei inverse. Numeroase observații experimentale au demonstrat că, spre deosebire de ribovirusurile tipice care se replică direct, după schema ARN → ARN, infecția cu virusuri oncogene ARN necesită sinteza unui intermediar de ADN nou, viral, după schema ARN → → ADN → ARN.

După cum este știut, actinomicina D este un antibiotic care interferă cu procesul de transcriere ADN → ARN, deoarece în celula normală se leagă solid de ADN, împiedicînd ARN-polimeraza să-și îndeplinească funcția. În cazul celulelor infectate cu virusuri ARN obișnuite, actinomicina D stopează orice fel de sinteză de ARN, cu excepția sintezei de ARN specific viral (genom viral). În cazul oncornavirusurilor ea inhibă producerea totală de orice fel de ARN, inclusiv ARN viral, și, în consecință, inhibă replicarea VSR.

O probă fără echivoc pentru necesitatea absolută a sintezei de ADN nou viral a fost adusă de Bader (1965): blocarea sintezei de ADN, în primele 8—12 ore după infecție, cu ajutorul inhibitorilor sintezei de

---

*) Terminologia referitoare la constituenții interni ai oncornavirusurilor este confuză, din cauza faptului că în unele lucrări termenii de nucleoid și corpuscul central viral sînt frecvent folosiți ca echivalenți. Corect, nucleoidul corespunde componenților interni nucleoproteinici (genom ARN + proteină virală) ai corpusculului central, care este format din nucleoid + capsidă virală (capsomerele și „membrana" proteică pe care acestea sînt așezate simetric).

ADN (fluordezoxiuridină, citozinarabinozid, amethopterină), are drept urmare protejarea celulelor de infecția cu VSR.

Transcriptaza inversă sau revers-transcriptaza*) este o enzimă descoperită independent de Temin și Baltimore (1970), capabilă să catalizeze sinteza de ADN de la precursori dezoxinucleotidtrifosfați (dNTP), utilizînd ca model natural ARN. Ea a fost numită inițial ADN-polimeraza *dependentă* de ARN, deoarece produsul său este ADN, iar modelul ARN. Ulterior, cînd s-a demonstrat capacitatea transcriptazelor inverse de a folosi ca model, pe lîngă ARN, și ADN, ca și hibrizi de ARN—ADN, Temin și Baltimore (1972) au propus denumirea de ADN-polimerază *dirijată* de ARN.

Activitatea transcriptazei inverse este dependentă de un ARN inițiator cu o grupare liberă 3'-OH, iar sinteza de ADN se desfășoară în direcția 5' → 3'. Dependența de un inițiator înseamnă că enzima poate să alungească molecule de acizi nucleici, dar nu poate iniția sinteza *de novo*. ADN nou format este atașat covalent de molecula de ARN inițiator și legat prin punți de H cu catena care a servit ca matriță.

Transcriptazele inverse diferă de ADN-polimerazele celulare normale prin aceea că au o structură de polipeptid unic, au o activitate ribonucleazică asociată și sînt capabile să facă la fel de ușor copii după modelul ARN, ca și după ADN. Ele sînt prezente în cele mai multe celule normale, fără ca prezența lor să fie corelată obligator cu oncogeneza (fig. 83).

Evoluția infecției cu virusul sarcomului Rous

VSR exogen este inițial adsorbit pe suprafața celulei sensibile, după care pătrunde în celulă prin pinocitoză. După decapsidare, genomul viral (ARN m.c.) eliberat de învelișurile care îl acoperă este transcris de transcriptaza inversă la ADN m.c. complementar. În timp ce se găsește încă în citoplasma celulei, ADN m.c. este convertit la ADN d.c. circular, care migrează în nucleu. În această formă, ADN d.c. devine provirus, prin integrarea sa în cromosomul gazdei, printr-un proces de recombinare asemănător celui descris la fagul λ și *E. coli*. Circularizarea ADN este o condiție prealabilă pentru integrare, iar integrarea condiționează transformarea celulară și formarea de virus progen. Integrarea poate avea loc în toate fazele ciclului celular și necesită prezența enzimelor care controlează recombinarea genetică.

După integrare, provirusul ADN este transcris în mod preferențial la ARNm 35S de către ARN-polimeraza II de tip eucariot. Cea mai mare parte din acest ARN este legată de ribosomii și polisomii liberi în citoplasmă, determinînd prin traducerea sa sinteza de proteine virale. O parte din ARNm 35S se fixează pe ribosomii legați de membrane și servesc pentru sinteza proteinelor învelișului extern viral, care sînt inserate inițial în reticulul endoplasmic.

---

*) Denumirea *reverse transcriptaze*, dată de un corespondent anonim al revistei engleze „Nature", este frecvent folosită, mai ales în limbajul curent, deși este neagreată de descoperitorii săi, ca fiind ambiguă.

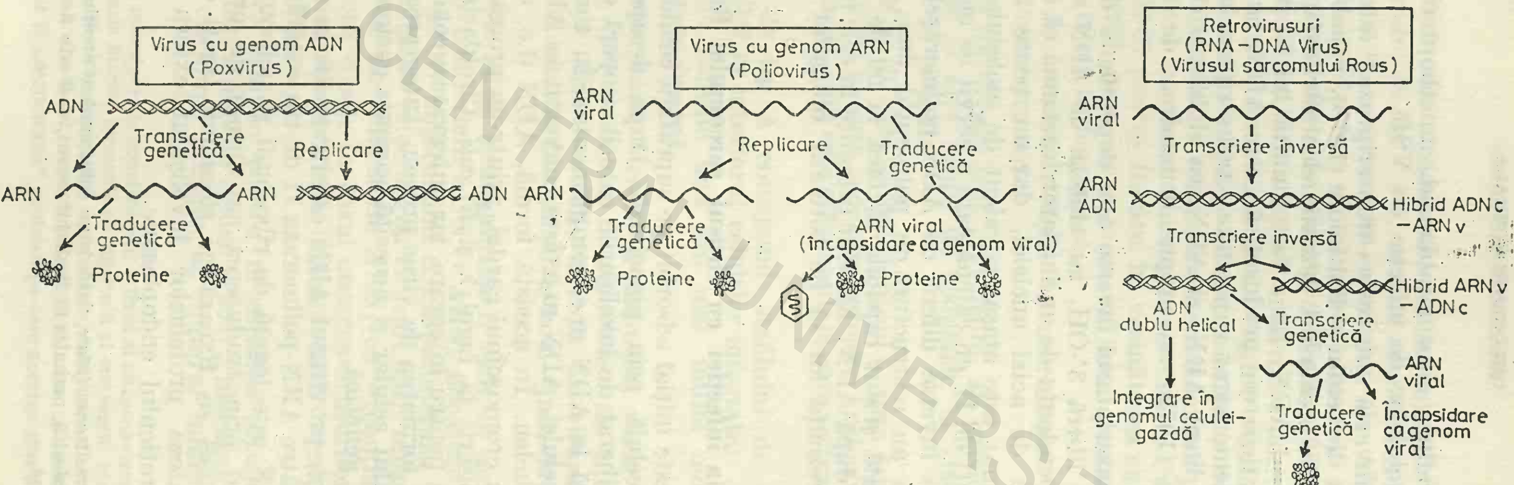


Fig. 83. — Modalitățile de transcriere și traducere genetică la virusurile cu genom ADN, ARN și retrovirusuri.

ARNm este tradus inițial integral sub forma unor polipeptide—precursori mari — care apoi sînt clivate în proteine funcționale. Pe măsură ce infecția progresează tot mai mult, ARN sintetizat se combină cu proteinele nucleoidale. După ce este acoperit de capsomere se deplasează spre supra-

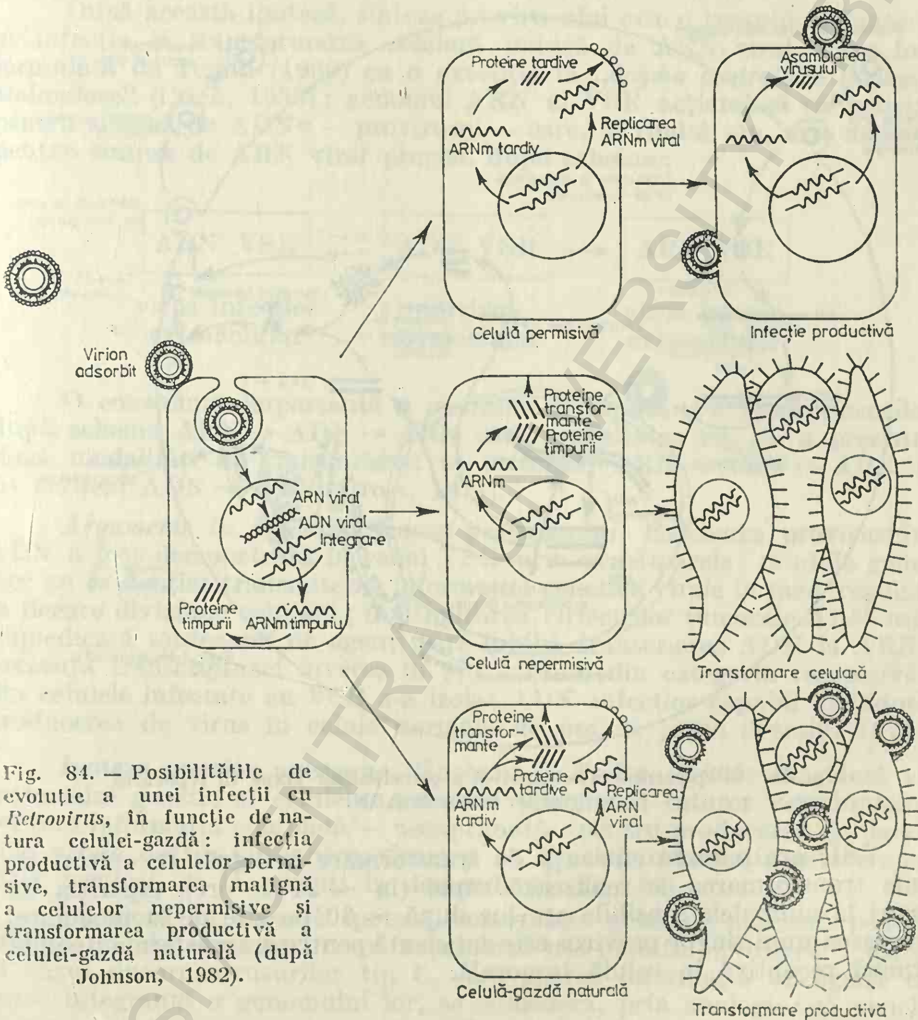


Fig. 84. — Posibilitățile de evoluție a unei infecții cu *Retrovirus*, în funcție de natura celulei-gazdă: infecția productivă a celulelor permisive, transformarea malignă a celulelor nepermisive și transformarea productivă a celulei-gazdă naturală (după Johnson, 1982).

fața celulei, unde își formează învelișul extern prin acoperire cu porțiuni de membrană plasmatică în care s-au inserat glicoproteinele virale. Cînd învelișurile virale sînt complete, virusul se detașează de suprafața celulei ca virus matur (fig. 84).

Replicarea virusurilor oncogene ARN nu interferă cu procesele celulare normale și, în consecință, celulele infectate nu mor în mod obligatoriu, ca în cazul virusurilor oncogene ADN. Ca urmare, în cursul unui

ciclu de diviziune fiecare celulă eliberează prin înmugurire mii de virioni. Dacă printre proteinele virale fabricate de celulele infectate apare și o proteină capabilă să modifice proprietățile celulei normale, retrovirusul devine tumorigen (Martin, 1970), (fig. 85).

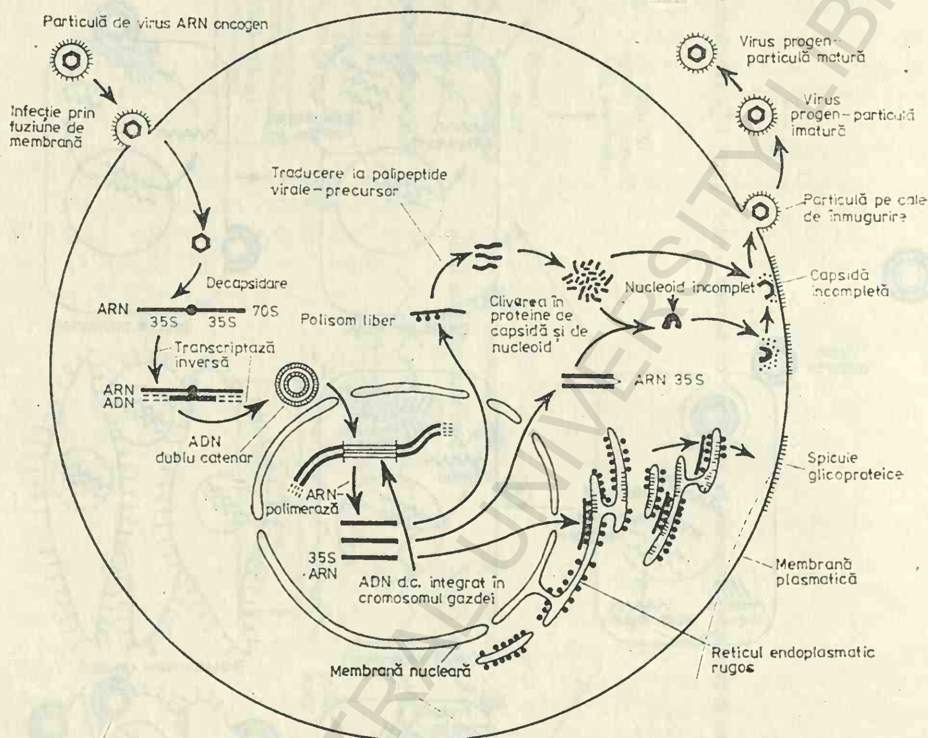


Fig. 85. — Reprezentarea schematică a principalelor etape în replicarea virusurilor tumorale ARN.

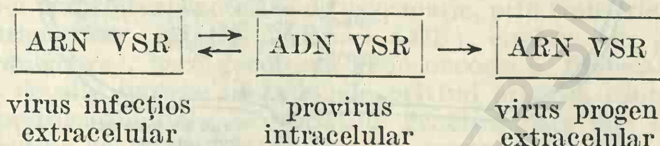
VSR are o mare eficiență de transformare malignă. În culturi de celule transformarea se realizează rapid (în ~ 24 de ore). Apariția de tumori la animalele sensibile are loc după ~ 30 de zile de la inoculare. Integrarea unui singur provirus este suficientă pentru a transforma o celulă normală receptivă în celulă tumorală.

Ipoteze privind mecanismele moleculare ale oncogenezei prin oncornavirusuri

Ipoteza provirusului sau a infecției virale exogene se bazează în esență pe ideea că ARN viral (ARNv) infectant este transcris invers la ADN și integrat în genomul celulei-gazdă ca provirus. În felul acesta, noțiunea de provirus capătă un cadru mai larg, provirusul corespunzînd

stării unui virus ADN sau a unei copii ADN a unui virus ARN tumoral (produsă de transcriptaza inversă), care este încorporat în cromosomul celulei-gazdă şi transmis de la o generaţie la alta (Temin, 1972). Ulterior, genomurile progene sînt transcrise după acest ADN integrat, exact aşa cum este transcris orice ARN normal.

După această ipoteză, sinteza provirusului este o treaptă obligatorie în infecţia şi transformarea celulară indusă de ARN viral. Ea a fost formulată de Temin (1960) ca o excepţie la *„dogma centrală a biologiei moleculare"* (Crick, 1958): genomul ARN al VSR acţionează ca matriţă pentru sinteza de ADNv — provirusul — care, la rîndul său, este matriţă pentru sinteza de ARN viral progen, după schema:



O consecinţă importantă a modului de replicare a retrovirusurilor după schema ARN → ADN → ARN este capacitatea lor de a prezenta două modalităţi de transmitere: a) orizontal ARN → ADN → ARN şi b) vertical ADN → ADN (Cross, 1974).

Argumente în favoarea ipotezei provirusului. Existenţa provirusului ADN a fost demonstrată în cazul VSR prin următoarele: studiile genetice au evidenţiat transmiterea informaţiei genetice virale în mod regulat, la fiecare diviziune celulară; multiplicarea virusurilor tumorale ARN este împiedicată totdeauna de agenţi care inhibă transcrierea ADN la ARN; prezenţa transcriptazei inverse în toţi virionii din categoria respectivă; din celulele infectate cu VSR s-a izolat ADN infecţios capabil să inducă producerea de virus în celule normale de pui de găină (Temin, 1974).

Ipoteza genelor oncogene. Huebner şi Todaro (1969) consideră că materialul genetic al celulelor somatice aparţinînd tuturor vertebratelor conţine informaţia completă — neexprimată — pentru producerea de particule virale de tip C (oncornavirus) şi că această informaţie este transmisă vertical, de la părinţi la descendenţi (fig. 86).

În acord cu această ipoteză, informaţia genetică necesară pentru producerea de oncornavirusuri reprezintă aşa-numitul „virogen". Ca şi în cazul oncornavirusurilor tip C, care poartă informaţia oncogenă ca parte integrantă a genomului lor, se consideră, prin analogie, că genele oncogene sînt o parte integrantă a virogenului. Deci „oncogenul" reprezintă acea parte din virogen care este răspunzătoare de transformarea celulei normale într-o celulă tumorală, deoarece poartă informaţia genetică necesară pentru sinteza proteinelor transformante.

În celulele normale, cele două categorii de gene sînt nefuncţionale, datorită prezenţei unor represori de natură proteică, care blochează exprimarea genomului viral. În funcţie de diferiţi factori modificatori, sistemul represor ar putea acţiona fie coordonat, pentru a controla expresia întregului virogen, fie independent, pe diferite categorii de gene, permiţînd

numai exprimarea parţială a unor determinanţi genetici. În cazurile în care exprimarea parţială include oncogenul, celula este transformată malign, indiferent dacă produce sau nu în acelaşi timp şi virus.

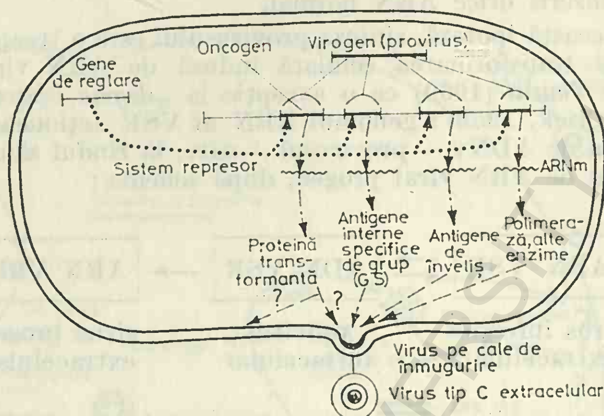


Fig. 86. — Reprezentarea schematică a ipotezei lui Huebner şi Todaro (1972) referitoare la controlul genelor oncogene şi virogene.

Ca urmare deci, transformarea malignă rezultă din distrugerea sistemului represor normal, care „ţine în şah" în celula normală atît informaţia oncogenă, cît şi pe cea virogenă. La unele virusuri, expresia completă a virusului poate fi extrem de rară, fie din cauza unor alterări sau deleţii la nivelul „virogenului", fie din cauza „tăriei" sistemului represor.

Diferiţi factori ca radiaţiile, substanţele chimice cancerigene, unele procese normale (ca îmbătrînirea) sau chiar infecţiile cu virusuri exogene pot interveni într-un anumit moment din viaţa animalelor, determinînd producerea fie de tumori, fie de virus, fie ambele.

Exprimarea spontană a informaţiei virale endogene pare să fie supusă unor controale complexe, la care participă atît gene virale, cît şi gene ale celulei-gazdă.

În condiţii naturale — chiar la om — după Huebner şi Todaro (1967), virusul oncogen s-ar transmite în anumite familii de la o generaţie la alta („vertical"), dar ar rămîne latent în majoritatea cazurilor. Din cînd în cînd, într-o generaţie sau alta ar produce tumori sau leucemii — aparent spontane — datorită intervalului mare de timp dintre cazuri.

Unele fapte de observaţie vin în sprijinul ipotezei oncogenului, ca de exemplu:

— ADN din celulele murine şi aviare conţine secvenţe omologe cu genomul viral (Bawda, 1972);

— apariţia oncornavirusului de tip C poate fi indusă prin tratarea unor celule normale cu agenţi mutageni fizici, chimici sau cu substanţe cancerigene (Lowy şi colab., 1971).

Spre deosebire de ipoteza provirusului, după care celula animală primeşte informaţia genetică de la un virus exogen şi o încorporează în genomul său, ipoteza genelor oncogene consideră că informaţia oncogenă reprezintă o parte intrinsecă a structurii genetice naturale a tuturor celulelor de vertebrate. Aceasta nu exclude posibilitatea ca în trecut, într-o anumită perioadă a evoluţiei organismului respectiv, informaţia oncogenă să fi apărut din afara lui, ca rezultat al transmiterii orizontale a unui virus infecţios, care a devenit apoi parte integrantă a celulei şi s-a transmis vertical.

Ipoteza protovirusului încearcă să explice apariţia transformării maligne ca rezultat al unor procese variaţionale (Temin, 1974), care apar în cursul unor transferuri succesive de informaţie, prin transcriere (ADN → ARN) şi transcriere inversă (ARN → ADN), cuplate cu „accidente" *(erori de transcriere)*, care generează gene oncogene. Ipoteza protovirusului diferă de alte ipoteze mutaţionale privind originea cancerului prin faptul că postulează ideea că variaţiile genetice care duc la formarea genelor oncogene se produc într-o zonă a genomului celulei normale în care are loc un transfer de informaţie după schema ADN (genom celular) →ARN → ADN, care ar putea genera noi secvenţe de acizi nucleici. În felul acesta, apariţia genelor tumorale ar fi rezultatul unei evoluţii greşite în acest sistem normal de transfer al informaţiei genetice (fig. 87).

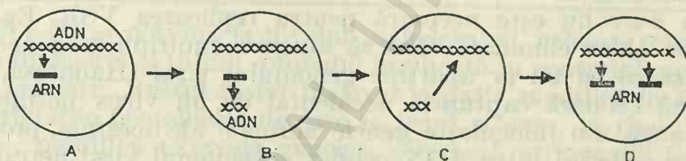


Fig. 87. — Ipoteza protovirusului implică ideea că sinteza ADN dependentă de ARN poate fi importantă în procesele celulare normale. Unele regiuni de ADN din celulele normale servesc ca matriţă pentru sinteza ARN (A). Acest ARN, la rîndul său, serveşte ca matriţă pentru formarea de ADN prin transcriere inversă (B), care, ulterior, se integrează în ADN celular (C). Amplificarea anumitor regiuni ale ADN, rezultată din repetarea acestui proces (D), în asociere cu alte procese care introduc modificări în structura ADN, poate juca un rol important în diferenţierea embrionară a celulelor.

Evoluţia procesului mutaţional s-ar face pe două căi diferite: prima ar duce prin evoluţie greşită la apariţia unui ribodezoxivirus, iar cea de-a doua la apariţia genelor oncogene.

Protovirusul ia naştere dacă informaţia genetică — într-un anumit stadiu al acestui ciclu — capătă o fază stabilă, distinctă de progenitorul său ADN şi potenţial infecţioasă pentru alte celule. Denumirea de protovirus reflectă, dealtfel, caracterul său potenţial infecţios pentru alte celule. Particulele de oncornavirus, în ultimă instanţă, provin din copierea unui segment de genom celular de la ADN la ARN.

În sprijinul acestei ipoteze, Temin susţine că procesul de transfer al informaţiei genetice după schema ADN → ARN → ADN ar fi un proces normal, la vertebrate formarea de secvenţe noi avînd un rol important în diferenţierea celulară, în asigurarea diversităţii anticorpilor, în amplificarea genică şi în memoria imunologică. Ocazional, acest proces ar duce la

formarea de secvențe noi, probabil nu la întîmplare, ci în funcție de natura segmentului de genom utilizat ca model, precum și a polimerazelor folosite. Prin acest proces s-ar forma fie virusuri noi cu genom ARN, care devin oncogene, fie noi secvențe capabile de transformare malignă, în absența virusului.

Genele cancerigene

Sub denumirea de *gene cancerigene* sînt grupate genele care codifică proteine cu rol în transformarea malignă („proteine transformante"). Virusul sarcomului Rous are o singură genă cancerigenă (Dulbecco, 1979) — gena *v-src*. Ea poate fi identificată prin efectul mutațiilor sensibile la temperatură (*ts-src*; ts = termosensibile), care modifică structura genei în așa fel încît poate funcționa la 32°C, nu însă și la 40°C. Ca urmare, la temperaturi scăzute (32°C) culturile de fibroblaști infectate cu virusul mutant prezintă aspectul de celule transformate (colonii dense, globuloase). Trecute la temperaturi ridicate (41°C), celulele transformate redevin rapid normale (colonii plate, dispersate), pentru ca readuse la 32°C să devină din nou transformate malign. În cursul acestor treceri reversibile de la normal la tumoral, întreaga gamă de proprietăți ale celulelor se schimbă aproximativ în același timp, ceea ce demonstrează că o singură genă de cancerizare controlează ansamblul modificărilor care caracterizează celula transformată.

Gena *v-src* nu este necesară pentru replicarea VSR. Ea poate fi alterată sau chiar eliminată fără să afecteze multiplicarea acestuia. De aici ipostaza că ea nu ar aparține genomului viral (Hanafusa, 1978), ci ar fi o genă celulară capturată accidental de un virus netransformant, care se adaugă sau înlocuiește genele normale ale acestuia, probabil prin recombinare genetică între ADN celular și genomul viral netransformant (Opperman, 1979; Bishop, 1981; De Woude, 1982). Pînă în prezent au fost identificate 18 gene de acest tip aparținînd la diferite virusuri și denumite generic gene *v-onc* (Dulbecco, 1982; tabelul nr. 9).

Proteinele transformante. Gena virală *src* („*v-src*") codifică sinteza unei proteine cu rol-cheie în formarea tumorilor, numită *pp 60 v-src* (pp = fosfoproteină; 60 corespunde greutății moleculare de 60 000 daltoni, iar *v-src* arată originea sa genetică, respectiv gena virală *src*). Ea are funcție enzimatică de proteinkinază și este capabilă să lege ioni de fosfat de anumiți aminoacizi componenți ai proteinelor celulare, prin reacții de fosforilare.

Proteinkinazele codificate de virusurile oncogene fosforilează în mod specific tirozina. Deoarece fosforilarea proteinelor reprezintă una din modalitățile principale de reglare a creșterii celulare, enzimele care produc acest proces pot altera ușor funcționarea normală a unei celule. În celulele transformate malign cantitatea de tirozină fosforilată crește de ~ 10 ori față de normal (Hunter și Sutton, 1980).

Este probabil că *pp 60 v-src* ar acționa fosforilînd și alte numeroase proteine celulare (prin intermediul treoninei, serinei, histidinei etc.), afectînd funcția fiecăreia dintre ele și declanșînd o cascadă de evenimente în serie, care, în final, determină transformarea unei celule normale într-o celulă malignă (Bishop, 1982). După Collett și Erickson (1978), *proteinki-*

Tabelul nr. 9

Principalele gene oncogene prezente în genomul retrovirusurilor (după Dulbecco, 1982)

Denumirea genei	Gazda	Denumirea virusului care o poartă	Denumirea genei	Gazda	Denumirea virusului care o poartă
src	păsări	V. sarcomului Rous și alte virusuri sarcomatogene	*abl*	șoarece	V. leucemiei Abelson
fps	păsări	V. sarcomului Fujinami și alte virusuri sarcomatogene	*mos*	șoarece	V. sarcomului Moloney
yes	păsări	V. sarcomului Y73 și alte virusuri sarcomatogene	*fos*	șoarece	V. osteosarcomului FBJ
ros	pui de găină	Virusul UR2	*bas*	șoarece	V. sarcomului șoarecelui alb
myc	păsări	V. mielocitomatozei aviare	*ras-ki*	șoarece	V. sarcomului Kirsten
erb A	păsări	V. eritroblastozei aviare	*ras-ha*	șoarece	V. sarcomului Harvey
erb B	păsări	V. eritroblastozei aviare	*fes*	pisică	unele virusuri sarcomatogene
myb	păsări	V. mieloblastozei aviare	*fmc*	pisică	unele virusuri sarcomatogene
rel	păsări	V. tumorilor sistemului reticuloendotelial	*sis*	maimuță	V. sarcomului maimuțelor

naza pp 60 v-src ar acționa la nivelul „scheletului" celular, reprezentat de o rețea de filamente și tubuli, probabil implicată în controlul mecanismelor diviziunii celulare. Restul fosfat încărcat negativ modifică în foarte înalt grad proprietățile proteinelor de care se leagă și care, la rîndul lor (după fosforilare), modifică expresia genelor, alterează structurile filamentoase care controlează forma și mobilitatea celulelor, modifică forma enzimelor și a proteinelor care participă în transportul moleculelor în celule.

Prin fosforilarea unor proteine constitutive, kinaza ar provoca o dispersare și o dezorganizare a citoscheletului, întrerupînd semnalele normale care controlează diviziunea, antrenînd astfel o proliferare anarhică și celelalte modificări caracteristice transformării maligne.

Proteinkinaza necontrolată poate produce, de asemenea, fosforilarea anormală a diferite categorii de proteine celulare, alterîndu-le funcțiile și producînd pleiomorfismul caracteristic al transformării care părea atît de greu de explicat. După Bishop (1982), *pp 60 v-src* se concentrează la nivelul anumitor proteine specifice (de ex., vinculina) din structura plăcilor de adeziune (regiuni ale membranei celulare care aderă de suprafețele solide), pe care le dezorganizează, scăzînd adeziunea intercelulară și favorizînd desprinderea celulelor de țesutul lor și apariția metastazelor. Proteinele transformante, localizate la nivelul membranei celulare, ar putea influența procesul de transformare și prin modificarea schimbului de ioni dintre celulă și mediul extern, prin alterarea metabolismului întregii celule, precum și prin stimularea formării de ADN (fenomen prealabil diviziunii celulare).

Prezența genelor cancerigene în celulele normale. Stehelin, Bishop și colab. (1976) au demonstrat că genele *src* VSR hibridează cu o por-

țiune din ADN prezent în patrimoniul genetic al celulei-gazdă, fapt care demonstrează prezența unor secvențe nucleotidice similare în structura acestuia. Ulterior, această secvență, corespunzînd genei *c-src* (c = celulară) sau *sarc* endogenă, a fost izolată cu ajutorul tehnicilor de inginerie genetică, demonstrîndu-se, totodată, și capacitatea sa de a transforma malign celulele normale în care este introdusă (Blair și Van de Woude, 1980). Informația care codifică proteina genei *c-src* este divizată în 7 regiuni separate (exoni) prin intermediul unor secvențe intercalate sau introni, care nu se întîlnesc în cazul genei *v-src*. Cu excepția prezenței acestor introni, genele *c-src* identificate la mai multe specii de pești, păsări și mamifere sînt, toate, înrudite cu gena virală *v-src* (fig. 88).

Proteina celulară *pp 60 c-src* este similară ca mărime, structură chimică și funcție cu proteina virală *pp 60 v-src*, prima fiind legată de membrana plasmatică normală, iar cea de-a doua de membrana celulelor transformate malign.

S-a demonstrat că numeroase retrovirusuri au corespondenți strîns înrudiți în genomurile normale ale unor specii de vertebrate. Este probabil că genele *sarc* endogene și echivalenții lor celulari pentru alte virusuri ar fi funcționale în cursul dezvoltării embrionare cînd are loc procesul de diferențiere celulară. După această fază de evoluție normală (neoncogenă), genele respective ar deveni total inactive (represate) sau slab active din cauza activității scăzute a promotorului lor, așa cum se întîmplă frecvent și cu alte gene cunoscute în cursul diferențierii celulare normale (Westin, 1982; Muller și Verma, 1982). În celula normală, gena *c-src* ar funcționa foarte lent, asigurînd numai producerea unei foarte mici cantități de proteină *pp 60 c-src* cu activitate kinazică. Dovada experimentală este adusă de faptul că, izolate dintr-o celulă normală și transferate în alte celule, genele *c-src* nu produc transformarea malignă decît după legarea lor de un promotor viral (Oskazsson și De Woude, 1980). Potențialul lor cancerigen nu devine manifest decît cînd intră în acțiune într-un moment neoportun (de ex., la adult sau cînd gena este capturată de un virus și trece sub controlul unui promotor viral foarte activ, care o scoate de sub controlul normal).

Rolul genelor v-src în oncogeneză. Datele actuale pledează pentru ideea că oncogenele retrovirusurilor ar fi copii ale genelor *src* celulare, încorporate în unele genomuri virale preexistente, într-o perioadă trecută, nu prea îndepărtată. Au fost emise două ipoteze pentru a explica oncogeneza prin retrovirusuri, în acord cu prezența genelor *v-src* și *c-src*:

Ipoteza mutațională consideră că oncogenele virale diferă de genele celulare corespunzătoare prin diferențe subtile, dar importante, rezultate din mutațiile intervenite în cursul apariției genelor *v-src*, cînd genele celulare au fost copiate și introduse în genomul viral. Ca urmare, cele două proteine *(pp 60 v-src* și *pp 60 c-src)* s-ar deosebi prin mici diferențe în secvența aminoacizilor, datorită cărora ar avea ținte diferite în celulă și efecte diferite asupra comportamentului acesteia, efectul transformant fiind caracteristic produsului genei *v-rsc* (Dulbecco, 1979).

Ipoteza dozajului sugerează că infecția cu un retrovirus exogen ar determina producerea în exces de proteinkinază, supraîncărcînd celula cu o proteină care în mod normal este necesară bunei funcționări celulare

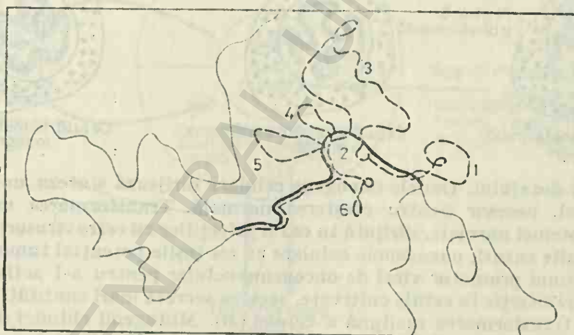


Fig. 88. — Evidenţierea oncogenelor celulare şi virale prin microelectronografie. ADN viral şi celular care poartă genele respective (*src-v* şi *src-c*) a fost izolat şi denaturat, formînd din ADN d.c. molecule monocatenare, care au fost puse în condiţii care permit formarea de molecule hibride. După cum se evidenţiază din schemă, gena virală (▬▬) şi cea celulară (- - - -) formează un heteroduplex. ADN suplimentar, diferit ca informaţie, necesar pentru clonarea genelor, este marcat cu linie subţire continuă (——). Buclele formate de oncogenele celulare prezintă 6 introni (1—6), care întrerup secvenţele cu rol de codificare (exoni). Această caracteristică a multor gene celulare şi a unor virusuri nu este întîlnită la retrovirusuri, ceea ce demonstrează că oncogenele au originea în celulă şi nu sînt introduse de virusuri (după Parker, din Bishop 1982).

(fig. 89). Apariția transformării maligne prin retrovirusuri oncogene ar fi corelată mai degrabă cu cantitatea de proteină virală, decît cu proprietățile specifice ale acesteia. Date de observații preliminare favorizează

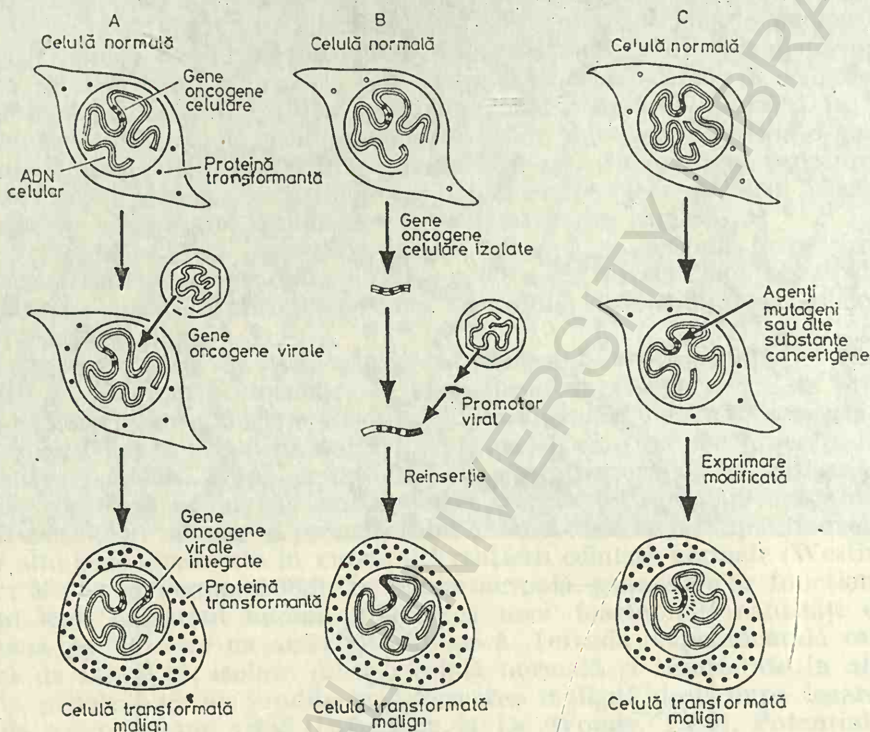


Fig. 89. — Ipoteza dozajului. Genele oncogene celulare dirijează sinteza unei cantități de produs proteic normal, necesar pentru creșterea normală. Transformarea malignă rezultă din supraproducția proteinei normale, dirijată în cazul infecțiilor cu retrovirusuri de genele oncogene virale (A). În anumite cazuri, oncogenele celulare au ele înșile potențial tumorigen, fapt demonstrat prin legarea unui promotor viral de oncogenul celular pentru a-l activa și a-i determina exprimarea. După reinserție în celule cultivate, acestea secretă mari cantități de produse oncogene, determinînd transformarea malignă a celulei (B). Mutagenii chimici și substanțele cancerigene pot converti celulele normale în celule tumorale, mărind activitatea oncogenelor celulare și sinteza produsului proteic al acestora (C) (după Bishop, 1982).

ipoteza dozajului genelor: cantitățile de proteine produse de un oncogen viral sînt mult mai mari decît normal, probabil pentru că semnalele care dirijează activitatea genelor retrovirale sînt mult mai puternice.

Rolul genelor c-src în oncogeneză. Identitatea de funcție a genelor *v-src* și *c-src* și dovezile experimentale în sprijinul ipotezei dozajului duc la concluzia că în anumite circumstanțe este posibil ca genele celulare înșile să poată induce cancerul, dacă activitatea lor este amplificată anormal prin intervenția unor virusuri neoncogene sau a unor agenți fizici sau chimici mutageni sau cancerigeni. Van de Woude și Scolnik (1980) au demonstrat că genele oncogene celulare izolate, legate de un promotor viral (secvență din genom care reglează exprimarea unor gene apropiate), induc transformarea malignă în culturi de celule. Celulele transformate

conţin o cantitate foarte mare de *pp 60 c-src*, deoarece genele *src* celulare lucrează mult mai intens sub control viral decît sub control celular. Aceasta demonstrează că genele oncogene celulare ar putea face parte dintr-o reţea foarte fin echilibrată de mecanisme de control, care reglează creşterea şi dezvoltarea celulelor normale, şi că funcţionarea lor anormală sau prea intensă poate altera echilibrul reglării, favorizînd trecerea de la creşterea normală la creştere şi multiplicare excesivă. Printr-un mecanism asemănător, virusurile neoncogene inserate în genomul celular, în vecinătatea imediată a unor gene oncogene celulare, ar putea amplifica masiv exprimarea lor, determinînd apariţia cancerului. În mod similar, agenţii mutageni sau cancerigeni asociaţi cu anumite substanţe „promotoare" care au ca efect principal schimbarea stării de diferenţiere a celulelor sau modificarea activităţii ansamblului genelor ar putea intensifica în mod anormal activitatea genelor *c-src*, fie acţionînd direct asupra lor, fie indirect, blocînd activitatea unor gene care în mod normal controlează intrarea lor în acţiune (fig. 90). În felul acesta, celulele normale ar purta în

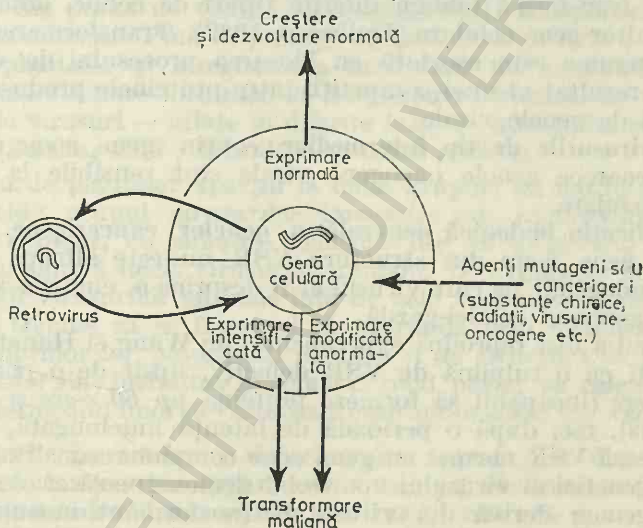


Fig. 90. — Explicarea unitară a diferitelor forme de cancer, bazată pe conceptul genelor de cancer. Elementul central comun este reprezentat de un grup de gene celulare necesare pentru creştere şi dezvoltare normală. Transplantate în genomul unui retrovirus (stînga) acestea devin gene oncogene virale. Funcţionarea lor mai poate fi afectată şi/sau intensificată de diferite substanţe mutagene sau cancerigene (după Bishop, 1982).

structura lor genetică germenii propriei lor distrugeri, sub forma genelor de cancer *(c-src)*, care pot deveni foarte active ori de cîte ori structura sau controlul reglării lor sînt anormal modificate (Bishop, 1982). Oncogeneza ar fi rezultatul a două acţiuni : stimularea întîmplătoare a unei gene oncogene şi modificarea altor gene celulare, necesare pentru ca gena *onc* activată să-şi poată exprima funcţia transformantă.

Virusurile care produc cancere ale sîngelui (leucemii sau boli ale liniei eritroide) la păsări, deşi nu conţin gene *v-onc* în genomul lor (ele nu transformă malign celulele cultivate *in vitro*), au, de asemenea, echivalenţi celulari sub forma unor gene *c-onc* endogene, care fac parte din structura

genetică normală a celulelor respective și care par să participe deopotrivă în procesele de diferențiere celulară normală. Aceste virusuri acționează prin intermediul activării genelor *onc* celulare, dar nu prin încorporarea lor în genomul viral, ci printr-un mecanism invers, de integrare a genomului viral oncogen în ADN celular, în vecinătatea genelor *c-onc*. Trecerea acestora sub controlul promotorului viral care se substituie celui celular, practic inactiv, mărește rata de transcriere a genei *c-onc* la situsul său normal celular și, prin aceasta, cantitatea de proteină transformantă. Aceste virusuri se manifestă foarte lent (transformarea apare la cîteva luni după inoculare), deoarece integrarea lor în genomul celular se face la întîmplare și șansele de legare în vecinătatea genei *c-onc* sînt foarte mici, fapt care explică absența capacității transformante în culturi de celule.

Virusurile leucemigene afectează numai celule sanguine aflate în anumite stadii de diferențiere și induc tipuri diferite de leucemii. Aceasta demonstrează dependența acțiunii lor de „repertoriul de gene" exprimat într-o anumită fază de diferențiere, spre deosebire de virusurile sarcomatogene care transformă malign diferite tipuri de celule, independent de activitatea altor gene celulare (Dulbecco, 1982). Transformarea malignă a celulelor sanguine este asociată cu blocarea procesului de diferențiere, probabil ca rezultat al unei competiții între proteinele produse de genele endogene și de genele virale.

Retrovirusurile de tip intermediar conțin gene *v-onc* dar produc leucemii, deoarece genele oncogene virale sînt sensibile la exprimarea altor gene celulare.

Semnificația biologică generală a genelor cancerigene. După unii cercetători, gena *v-src* din structura VSR nu este altceva decît gena *c-src (sarc* endogenă) pe care virusul ar fi desprins-o, cînd s-a separat prin excizie din genomul celulei-gazdă.

Procesul a fost reprodus experimental de Wang și Hanafusa (1980): puii infectați cu o tulpilnă de VSR defectiv, lipsit de o porțiune mare din gena *c-src* (incapabil să formeze proteina *pp 60 c-src* și să producă sarcom Rous), fac, după o perioadă de latență îndelungată, tumori din care se izolează VSR normal cu gena *v-src* complet reconstituită. Studiul markerilor genetici ai virusului nou izolat demonstrează că cea mai mare parte din genom derivă din virusul netransformant inoculat originar, ceea ce face probabilă posibilitatea formării sale prin recombinarea secvențelor reziduale ale genei *v-src*, prezentă în genomul virusului inoculat, cu gena *c-src* a celulelor-gazdă. Virusul astfel reconstituit induce transformarea malignă și producerea de tumori, deși ~ 3/4 din structura oncogenelor virale proveneau din gene celulare.

Alte exemple demonstrează, de asemenea, că genele *v-onc* și *c-onc* în general par foarte înrudite (Der, 1982; Parada, 1982; Santos, 1982). Astfel, genele *c-onc* din cancerul vezicei urinare umane sînt aproape omoloage celor din virusul *Ras Ha murin*, iar proteinele transformante produse de genele *src* și *yes* sînt aproape identice, ceea ce pledează în același sens. Aceasta demonstrează că repertoriul genelor *v-onc* și *c-onc* este foarte limitat și că, în unele cazuri, ele ar fi chiar identice. Păstrarea lor la specii atît de îndepărtate din punct de vedere sistematic sugerează ipoteza că genele *onc* în general ar deriva dintr-un număr mic de strămoși comuni (Dulbecco, 1982).

Virusurile plantelor

(Pl. 25)

Virusurile plantelor au o deosebită importanță ca agenți patogeni datorită marii lor răspîndiri și faptului că același virus poate infecta plante, importante din punct de vedere economic, relativ îndepărtate din punct de vedere taxonomic. Pînă în prezent au fost descrise cîteva sute de boli virale ale plantelor și înregistrarea unor boli noi continuă. Virusurile plantelor bine studiate formează 25 de grupuri distincte, în timp ce alte peste 200 de virusuri — aflate în diferite faze de caracterizare — sînt încă negrupate (Zaitlin, 1977 ; Hamilton și colab., 1981).

Virusurile plantelor aparțin la două grupuri cu morfologie și simetrie distinctă: grupul *virusurilor izometrice* sau *izodiametrice* și *grupul virusurilor alungite,* cu simetrie helicală. Ele au în general o structură chimică mai simplă decît virusurile animale. O explicație teleonomică a complexității virusurilor animale față de cele vegetale o constituie faptul că primele trebuie să se fixeze și să pătrundă prin membrana celulară, pe baza propriilor lor proprietăți chimice și de structură, în timp ce virusurile plantelor sînt introduse în celulă în mod pasiv, pe calea unor leziuni sau prin intermediul unor nevertebrate care acționează ca vectori.

Virusurile izometrice se deosebesc nu numai prin dimensiuni, ci în special prin forma (conturul) particulei virale pe electronografii, care poate fi rotundă și netedă *(Cucumo-, Bromovirus)*, rotundă și cu proeminențe pe suprafață *(Tombus-, Tymovirus)*, ovoidală sau sferică imperfectă *(Ilarvirus)*, unghiulară *(Nepo-, Comovirus,* virusul necrozei tutunului) etc.

Virusurile alungite pot apărea ca particule baciliforme rigide cu un canal axial *(Tobamo-, Tobravirus)*, ca bastonașe ușor flexuoase, cu striuri transversale *(Potex-, Carlavirus)*, flexuoase *(Potyvirus)* sau foarte flexuoase *(Closterovirus)* (fig. 91).

Cele mai multe virusuri ale plantelor au genom ARN monocatenar, fie sub forma unui mic genom, prezent ca o moleculă unică (cu g.m.$\sim$ 3—4 $\times 10^6$ dal sau chiar inferioară), fie sub forma unui genom divizat, format din 2—4 specii de ARN diferite. Deși sînt genomuri primitive prin faptul că au o cantitate relativ mică de informație genetică, ele se comportă ca înalt diferențiate deoarece reușesc cu acest genom mic să învingă rezistența gazdei (Van Vloten-Doting, 1978). Virusurile mai mari, de exemplu virusurile care produc piticirea orezului, piticirea rugoasă a porumbului ș.a., conțin un genom ARN d.c. (g.m. 15 $\times 10^6$ dal).

VIRUSURI FĂRĂ ÎNVELIȘ EXTERN

VIRUSURI CU ÎNVELIȘ EXTERN

ADN d.c.

Caulimovirus (Mozaicul conopidei)

ARN d.c.

Reoviridae

ADN m.c.

Geminivirus (Stricul porumbului)

ARN m.c.

Alfaalfa mosaic virus (Mozaicul lucernei)

Bromovirus (Mozaicul obsigei)

Nepovirus (Pătarea inelară a tutunului)

Comovirus

Virusul mozaicului nervurian al mazării

Tymovirus (Mozaicul galben al napului)

Tombusvirus (Piticirea tomatelor)

Virusul necrozei tutunului

Piticirea clorotică a porumbului

Luteovirus (Piticirea galbenă a orzului)

Hordeivirus (Mozaicul dungat al orzului)

Tobravirus (Tobacco rattle)

Tobamovirus (Mozaicul tutunului)

Potexvirus (Virusul „X" al cartofului)

Carlavirus (Virus latent)

Potyvirus (Virusul „Y" al cartofului)

Closterovirus (Îngălbenirea gravă a sfeclei)

ARN m.c.

Rhabdoviridae (Îngălbenirea necrotică a salatei)

Virusurile ofilirii pătate a tomatelor

100 nm

Fig. 91. — Principalele grupuri de virusuri ale plantelor (după Matthews, 1979).

Excepţional, genomul virusurilor fitopatogene este reprezentat de ADN m.c., ca în cazul virusului mozaicului conopidei şi al răsucirii frunzelor la cartof.

Mecanismul de transmitere

Virusurile plantelor nu pot străbate bariera reprezentată de peretele celulozic al celulelor vegetale. De aceea, ele au nevoie de intervenţia unor agenţi externi, care să asigure „deschiderea" artificială a peretelui celular, permiţînd intrarea virusului în contact cu citoplasma. „Deschiderile" pot fi de mai multe tipuri şi mărimi, de la înţepături fine produse de insecte pînă la adevărate „fracturi" celulare (de exemplu, consecutiv ruperii perilor de pe frunze). La tutun, ruperea unui păr de pe frunză produce o rană cu $\varnothing$ 80 $\pm$ 30 nm, ceea ce corespunde la o suprafaţă de $\sim$ 2 000 – 10 000 nm^2.

Transmiterea propriu-zisă se realizează rar prin contactul întîmplător al virusurilor cu ţesuturile plantelor la nivelul acestor leziuni şi cel mai des este efectuată de vectori mai mult sau mai puţin specifici de tipul insectelor, nematodelor sau al unor ciuperci parazite. Mai rar, virusurile plantelor pot fi transmise „vertical" prin seminţe sau polen.

Transmiterea mecanică. Transmiterea prin atingere corespunde situaţiei în care virusul pătrunde într-o plantă sănătoasă prin răni foarte mici produse prin frecarea plantei receptoare de frunzele plantei infectate (ca rezultat al curenţilor de aer), avînd ca rezultat ruperea marginii frunzelor sau a perişorilor lor. Acest tip de transmitere este întîlnit în cazul virusurilor prezente în concentraţie mare în seva plantelor, la plante foarte receptive la infecţie şi care prin fragilitatea lor pot fi lezate uşor.

Transmiterea mecanică are loc şi prin contactul direct al rădăcinilor, ca şi în urma diferitelor practici agricole în cîmp, cînd seva plantelor virozate poate ajunge pe plantele sănătoase prin lezarea lor de către om cu ajutorul uneltelor.

Frecvent, virusurile fitopatogene sînt răspîndite de om în timpul înmulţirii vegetative, prin folosirea bulbilor, tuberculilor, lăstarilor, butaşilor proveniţi de la plante bolnave. Altoirea reprezintă o modalitate frecventă de răspîndire la pomii fructiferi.

Transmiterea prin vectori a fost demonstrată din anul 1895 (Takata) pentru virusul care produce nanismul orezului. De atunci au fost identificate aproximativ 400 specii de insecte *(Hemiptera, Heteroptera, Coleoptera, Orthoptera* şi *Thysanoptera*, precum şi unele acariene), care pot transmite cîteva sute de virusuri. Cele mai active sînt afidele şi cicadele. Dintre insectele vectoare, circa 87% au aparat bucal pentru supt, iar restul de 13% au aparat bucal pentru sfărîmat (Heinze, 1959).

Relaţia dintre virus şi insecta-vectoare este variabilă, putînd avea caracterul de simplă contaminare a aparatului bucal, cu capacitatea de transmitere temporară, de purtare de virus sau de infecţie virală (cu o perioadă de incubaţie înainte de a deveni apte de infecţie).

Persistenţa virusurilor în organismul vectorilor este variabilă şi corespunde la 3 situaţii diferite:

Virusurile nepersistente pot fi transmise numai o perioadă scurtă de timp (în general mai puţin de 4 ore la 20°C).

Virusurile semipersistente cu o capacitate de infectare variabilă între 10 şi 100 de ore.

Virusurile persistente cu o capacitate de infectare care depăşeşte 100 de ore, uneori chiar toată durata de viaţă a vectorului.

În funcţie de răspîndirea şi comportarea lor în organismul vectorului, virusurile fitopatogene se împart în trei categorii:

— *Virusurile localizate pe învelişul organelor de supt* sînt virusuri nepersistente. Principala lor caracteristică este că pot fi transmise imediat după contaminarea aparatului bucal (fără perioadă de incubaţie) şi cu maximă eficienţă imediat după supt. Eficienţa transmiterii scade la puţin timp după contaminare. Nu au nevoie de vectori specifici.

— *Virusurile circulante* sînt virusuri persistente care pot fi transmise timp îndelungat, uneori chiar toată viaţa vectorului. Ele ajung după supt în hemolimfa vectorului, după ce străbat peretele intestinal. Au preferinţă pentru vectori specifici şi nu se pot transmite decît excepţional prin mijloace mecanice.

— *Virusurile propagative* sînt virusuri persistente care se înmulţesc în organismul vectorilor şi îşi păstrează capacitatea de a fi transmise toată durata vieţii acestora. În unele cazuri pot fi transmise transovarian şi transstadial de la o generaţie la alta. Nu pot fi transmise pe cale mecanică.

Transmiterea prin intermediul microfungilor din sol. Unele virusuri patogene pentru plantele de cultură pot fi transmise prin intermediul unor ciuperci inferioare din sol ca: *Olpidium* sp., *Synchytrium endobioticum*, *Polymyxa graminis*. *Spongospora subterranea*, *Phythium ultimum* ş.a., care infectează rădăcinile cu ajutorul zoosporilor.

După germinare în radicele, microfungii perforează peretele celulelor şi se multiplică în interiorul acestora. Se formează un tal care va produce zoosporange, din care se eliberează noi zoospori, ce iniţiază un alt ciclu de infecţie.

Cînd celulele sînt infectate cu virusuri, talul fungilor se infectează şi zoosporii eliberaţi din zoosporange vor conţine virus, pe care îl vor transmite la alte rădăcini de plante sănătoase.

Transmiterea prin intermediul nematodelor. Unele nematode foarte mici, cu aparatul bucal transformat în stilet ca pentru înţepat, care trăiesc ca parazite în celulele superficiale ale rădăcinilor la un număr mare de plante, pot transmite o serie de virusuri patogene (Hewitt şi colab., 1958).

Virusurile transmisibile prin nematode pot fi grupate, după Cadman (1963), în două categorii:

1) *grupul Nepovirus* (Nematode borne polyhedral viruses) este format din virusuri izometrice care au ca vector nematode din genurile *Xiphinema* şi *Longidorus*;

2) *grupul Netuvirus* (Nematode borne tubular viruses) alcătuit din virusuri cu forma unor bastonașe tubulare alungite, cu simetrie helicală, transmise de nematode din genul *Trichodorus*.

Transmiterea prin semințe. Aproximativ 1/3 din virusuri se pot răspîndi prin semințe, deși infecția virală produce sterilitatea plantelor și semințele bolnave se deosebesc timpuriu prin aspectul lor modificat (deformarea și necroza cotiledoanelor). Infectarea semințelor are loc în cursul formării lor în planta virozată, iar în cazul plantelor sănătoase dacă polenul fecundat conține virus; în ultimul caz, eficiența este mult diminuată. Majoritatea virusurilor transmise prin sămînță sînt localizate în embrion, unde pot persista ani de zile. Există însă și virusuri care se localizează în endospermul seminței, în învelișul acesteia sau chiar în învelișul extern.

Evoluția infecției virale la plante

Virusurile plantelor se multiplică în anumite regiuni sau situsuri ale celulelor-gazdă. În cazurile în care punctul lor de contact primar cu celulele nu este identic cu situsul de replicare, virusul este transportat ca virion sau ca acid nucleic la nivelul acestor situsuri. Evoluția infecției a fost studiată cel mai bine, experimental, după leziuni mecanice, deoarece rănirea creează „situsuri infectabile", care după interacțiunea cu virusul infectat sînt transformate în „centri infecțioși". Situsurile infectabile ca atare au deci o durată limitată deoarece sau sînt convertite în centri infecțioși sau dispar.

Centrii infecțioși apar după două sau mai multe zile de la inițierea infecției și reprezintă rezultatul combinării dintre virus și situsul infectabil (Mundry, 1963). Observațiile bazate pe analiza numărului de leziuni formate, cînd frunzele sînt inoculate cu diferite concentrații de virus, demonstrează că probabil o singură particulă de virus este suficientă pentru a iniția un centru de infecție (Siegel și Zaitlin, 1964).

La început, centrii de infecție sînt formați dintr-o singură celulă infectată. Ulterior, infecția difuzează în jur, la celulele adiacente, probabil prin plasmodesme, și determină apariția de semne vizibile de infecție, obișnuit sub formă de leziuni necrotice, clorotice etc. Timpul necesar pentru ca virusul să ajungă de la suprafața frunzei infectate la celulele subepidermice este de 4—6 ore.

După ce virusul a părăsit țesutul parenchimatos al situsului primar, el se deplasează în regiuni îndepărtate ale plantei pe calea sistemului vascular. Cele mai multe virusuri au specificitate pentru un sistem dat fie pentru xilem, fie pentru phloem, fie ocazional pentru ambele. Transmiterea lor în plantă se pare că nu se face ca virioni, ci ca acid nucleic liber (Zech, 1952; Siegel, 1964).

Simptomatologia produsă de infecțiile virale ale plantelor (ca și spectrul de gazde) nu este riguros specifică pentru un virus dat și nu dă în mod obișnuit indicații privind identitatea virusurilor. Același virus

poate produce simptome diferite la plante diferite, în funcţie de starea fiziologică a plantelor şi de condiţiile de mediu. Frecvent, virusuri diferite pot fi asociate în aceeaşi plantă. Uneori, un anumit simptom poate indica un virus sau un grup de virusuri. Astfel, îngălbenirea poate fi produsă atît de *Luteovirus*, cît şi de *Closterovirus*, iar filozitatea tomatelor (caracterizată prin pătarea, deformarea accentuată şi reducerea suprafeţei frunzelor care apar ca frunze de ferigă, rămînînd în final reduse la nervura mediană, care le dă aspectul unor şireturi de ghete), poate fi produsă atît de virusul mozaicului castravetelui, cît şi de virusul mozaicului tomatelor. Diferenţe minore de tulpină între virusuri pot fi răspunzătoare de mari diferenţe de simptome, în timp ce în alte cazuri virusuri care diferă mult pot produce efecte similare. Factorii de mediu (în special lumina şi temperatura) pot influenţa net simptomele produse de un anumit virus.

Simptomatologia produsă de infecţiile virale ale plantelor este relativ limitată şi reprezentată predominant de următoarele tipuri de leziuni (Olga Săvulescu, 1967): a) *mozaic* (aspect marmorat cu pete verzui, galbene sau albicioase pe frunze, alternînd cu porţiuni de culoare normală sau verde închis); b) *cloroză* (pete generalizate sau localizate în special pe frunze, decolorate sau galbene pe organele verzi); c) *necroză* (leziuni localizate, pete circulare, inelare, alungite sau neregulate, galben-brune sau brun-negricioase şi dungi necrotice sau generalizate (mortificarea unei mari părţi sau chiar a plantelor întregi); d) *deformaţii* de tipul încreţirii şi răsucirii frunzelor, asimetrie sau atrofie a limbului („frunze de ferigă") la tomate; e) *atrofii* sau *proliferări anormale* (tumori); f) *modificări de culoare* ale florilor etc.

Plantele bolnave de viroze au un aspect deformat, vegetează slab, prezintă forme pitice din cauza inhibării creşterii, înfloresc şi fructifică slab (scăderile de producţie sînt foarte importante), au flori în majoritatea cazurilor sterile.

Frecvent, virozele plantelor evoluează latent sau inaparent, constituind rezervoare clandestine de virus în natură, ceea ce favorizează răspîndirea agenţilor patogeni la plantele de cultură. Rezervorul de virus în natură este asigurat şi de existenţa unui număr mare de plante-gazdă multianuale.

Viroizii

(Pl. 24, 25)

Viroizii reprezintă o categorie de agenţi patogeni infecţioşi subvirali — cei mai mici descrişi pînă în prezent — caracterizaţi printr-un genom alcătuit din ARN liber, cu dimensiuni mult mai mici decît ale celor mai mici virusuri cunoscute, prin absenţa capsidei şi a stadiului de virion.

În ciuda cantităţii mici de informaţie genetică pe care o introduc în organismele-gazdă, viroizii sînt capabili de replicare şi, în unele cazuri, produc boli grave, cu importanţă economică, ale plantelor. De exemplu : boala tuberculilor fusiformi la cartof („Potato spindle tuber disease"), nanismul şi marmorarea clorotică a crizantemelor („Chrysanthemum stunt disease"), nanismul hameiului („hopstunt disease"), boala „cadang-cadang" a cocotierului („Coconut cadang-cadang disease"), precum şi o boală caracteristică portocalilor şi lămîilor („Citrus exocortis disease") însoţită de distrugerea progresivă a scoarţei şi scăderea producţiei de fructe.

Structura moleculară

Viroizii au fost izolaţi cu ocazia încercărilor de a purifica şi caracteriza agentul patogen al bolii tuberculilor fusiformi la cartof o boală considerată anterior ca fiind de natură virală (Diener, 1971). Ei apar la microscopul electronic sub forma unor structuri lineare, ca nişte bastonaşe uşor încurbate avînd o lungime medie de 50 nm (de aproximativ 250 de ori mai mici decît genomul fagului T7) şi o grosime de 2—2,5 nm, separate sau grupate în agregate compacte (fig. 92).

Mc Clements şi Kaesberg (1977) au izolat din plantele de cartof bolnave 3 categorii de molecule, în formă de bastonaş, lungi de 50 nm şi altele circulare şi lineare avînd o lungime dublă, de ~100 nm. Hadidi (1977) consideră că moleculele circulare ar fi precursoare ale celor lineare, iar Diener şi Steere (1968) au demonstrat caracterul lor infecţios.

Greutatea moleculară a viroizilor cunoscuţi pînă în prezent variază între 75 000 şi 125 000 dal (6S — 15S).

Studiul biochimic al proteinelor izolate din ţesuturile infectate exclude posibilitatea existenţei unor particule virale convenţionale nucleoproteinice (după modelul virusurilor obişnuite) din care genomul ARN viroidal s-ar fi putut elibera în cursul extracţiei.

Fig. 92. — Dimensiunile viroizilor comparativ cu ale unor virusuri și cu bacteria *E. coli* (după Gross, 1980).

Fig. 93. — Structura moleculară a viroidului cartofului. A. Secvența bazelor și legarea lor în perechi. B. Reprezentare tridimensională (după Gross, 1981).

Structura moleculară a viroizilor este cu totul neobișnuită și este reprezentată de molecule de ARN monocatenar circulare, închise covalent, alcătuite din 359 de ribonucleotide (73A ; 17U ; 101G ; 108C) a căror structură primară (secvență) a fost stabilită cu exactitate (Sänger, 1978).

Structura lor secundară este, de asemenea, foarte caracteristică: datorită gradului foarte ridicat de complementaritate intramoleculară, un număr foarte mare de baze sînt „împerecheate" (legate perechi) în așa fel încît viroizii apar sub forma unor „cercuri turtite" și structuri în „ac de păr" cu aspect de ARN dublu catenar, dar care după denaturare revine la structura circulară sau lineară (fig. 93). După modelul lui Gross și Sänger (1978), structura secundară a viroidului cartofului ar fi aceea a unei molecule de ARN m.c. închisă, în care regiuni scurte dublu catenare (rezultînd din împerecherea intracatenară a bazelor) alternează cu regiuni și mai scurte monocatenare, sub forma unor „anse" (bucle) interne și terminale, corespunzînd regiunilor lipsite de baze complementare, care rămîn separate. Cele două „jumătăți" complementare ale acestui cerc închis covalent ar cuprinde 179, respectiv 180 de nucleotide, dintre care 244 (68%) ar fi legate perechi (73 G—C, 38 A—U, 11 G—U), ceea ce dă impresia că molecula de ARN ar avea ambele catene împerecheate pe toată lungimea lor. După McClements (1977), această structură de helice de ARN defectivă ar determina forma naturală a viroizilor ca structuri în formă de bastonașe alungite, cu un raport axial de 1:20, așa cum apar la microscopul electronic, cînd se examinează viroizii în stare normală (nedenaturată). După modelul propus de Langowski (1979), fiecare secvență helicală de 4—5 perechi de baze ar fi urmată de un „defect" sub forma unei bucle monocatenare de două baze.

Viroidul cartofului reprezintă primul agent patogen pentru un organism eucariot a cărui structură moleculară a fost complet stabilită.

Viroizii sînt sensibili la digestia cu ribonuclează și rezistenți la tratamentul cu solvenți organici, fenol și dezoxiribonuclează. Rezistența lor la ultraviolete este de 70—90 de ori mai mare decît a virusurilor, probabil datorită dimensiunilor foarte mici (volum prea mic al „țintei").

Replicarea viroizilor

Procesul de replicare a viroizilor este încă misterios datorită cantității foarte mici de informație genetică (suficientă numai pentru a codifica o proteină foarte mică, de ~ 70—80 de aminoacizi), ceea ce pledează pentru dependența aproape absolută față de gazdă, pentru replicarea lor.

Inițial, s-a considerat că genomul viroizilor nu ar fi format dintr-o singură specie moleculară, ci ar alcătui o populație de mai multe tipuri de molecule de ARN, cu lungime similară, dar cu secvențe nucleotidice diferite, care împreună ar forma un genom cu dimensiuni obișnuite pentru virusuri *(ipoteza genomului dispers)*. Datele mai noi demonstrează însă existența unei structuri uniforme a ARN viroidal, care în ciuda dimensiunilor mici este replicat ca atare în celulele sensibile.

O altă *ipoteză a virusului ajutător* („helper") considera că, genomul viroidal s-ar comporta ca un ARN satelit, a cărui replicare ar fi condi-

ționată de prezența universală, la solanaceele normale, a unui virus „ajutător" care furnizează o parte din informația genetică necesară replicării. Pînă în prezent însă nu a fost izolat nici un virus ajutător din plantele bolnave. Este foarte probabil că celula-gazdă furnizează sistemele biosintetice necesare replicării viroizilor, fără a exclude posibilitatea intervenției unor mecanisme diferite de cele care acționează în mod normal.

Întrucît **mecanismele moleculare ale replicării viroizilor** nu sînt cunoscute, au fost propuse două modele, în acord cu cunoștințele actuale de biologie moleculară (fig. 94) :

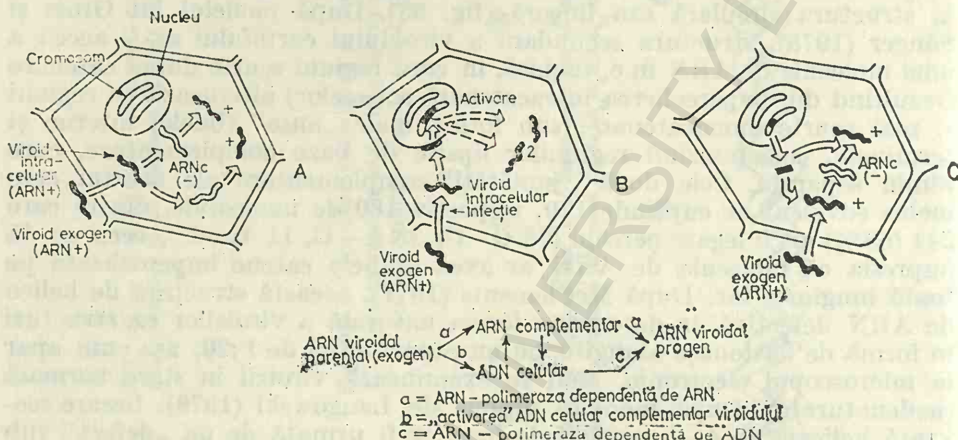


Fig. 94. — Reprezentarea schematică a ipotezelor referitoare la multiplicarea viroizilor. A. ARN viroidal infectant « + » este copiat la ARN complementar « — », care este recopiat la ARN « + » identic cu cel originar. B. ADN celular ar conține o secvență corespunzătoare ARN viroidal, care ar rămîne „tăcută" (represată) cît timp planta nu este infectată. C. Replicarea autonomă a ARN viroidal ar fi influențată de activarea unei gene cromosomale.

1. *Replicarea dependentă de ARN* s-ar face în mod analog replicării ARN viral (ARN → ARN), adică independent de ADN, pe calea unui ARN complementar celui al viroizilor. Ipoteza implică prezența unor molecule de ARN „replicative", dublu catenare, în celula-gazdă.

Replicarea s-ar realiza fie cu ajutorul ARN-polimerazelor prezente în celula normală înainte de infecție, fie cu ajutorul unei enzime noi, alcătuită din combinarea unui mic polipeptid codificat de ARN viroidal, cu unul sau mai multe polipeptide preexistente în celula-gazdă, pentru a forma o enzimă funcțională*⁾.

2. *Replicarea dependentă de ADN* ar fi efectuată de „mașinăria" celulară care sintetizează în mod normal ARN în celulă și s-ar face prin intervenția unei molecule intermediare de ADN complementar (ADNc).

Au fost propuse două modele de replicare, în acord cu ipotezele privind originea viroizilor :

Modelul de replicare ARN → ADN → ARN, în acord cu originea exogenă a viroizilor, implică sinteza în celulele infectate a unor molecule de ADN complementare (sub acțiunea transcriptazelor inverse din echipamentul enzimatic al celulei normale), care apoi servesc ca model pentru

*⁾ Situația este analogă celei a fagului Qβ, care este replicat de o polimerază alcătuită din patru polipeptide, dintre care unul este specific viral, iar celelalte aparțin bacteriei-gazdă.

formarea şi replicarea ARN viroidal prin transcrierea normală după schema ADN → ARN (Diener, 1976). Încercările de a izola un ADN nou sintetizat, complementar faţă de ARN viroidal, au rămas fără rezultat.

Modelul de replicare dependentă de ADN după schema ADN → ARN este în acord cu ideea originii endogene a viroizilor, care are ca punct de plecare ipoteza că informaţia genetică viroidală s-ar găsi codificată în una sau mai multe secvenţe de ADN din genomul celulelor sensibile. În organismele normale, această informaţie genetică ar fi represată, dar sub influenţa unor cauze încă necunoscute sau chiar prin infecţia cu un viroid exogen care ar acţiona ca amorsă, s-ar produce derepresia genelor respective şi prin transcrierea lor la ARN ar da naştere viroizilor. În favoarea acestei ipoteze pledează două fapte de observaţie :

1) Prezenţa în genomul plantelor sensibile la viroizi a unor secvenţe de ADN complementare faţă de ARN viroidal înainte de infecţie, fapt care sugerează posibilitatea producerii de molecule de ARN viroidal prin simpla transcriere a acestor secvenţe de ADN celular.

2) Actinomicina D, antibiotic care blochează specific transcrierea ADN → ARN, opreşte complet multiplicarea viroizilor, ceea ce pledează împotriva ipotezei de replicare autonomă după schema ARN → ARN.

Replicarea dependentă de ADN este considerată totuşi ca puţin probabilă şi nu a fost confirmată experimental. În această ipoteză este greu de explicat modul în care a persistat şi a fost menţinut represat de-a lungul evoluţiei un segment din molecula de ADN care conţine informaţie genetică dăunătoare pentru organismul respectiv. De asemenea, ar fi de aşteptat ca fenomenul de derepresie să se producă ocazional şi spontan, determinînd epidemii grave, ţinînd seama de larga răspîndire a plantelor cultivate sensibile.

Cele mai multe date experimentale pledează pentru ipoteza replicării pornind de la ARN viroidal infectant. Influenţa actinomicinei s-ar putea explica prin faptul că replicarea ARN viroidal ar depinde de transcrierea anumitor regiuni ale ADN celular, aşa cum se întîmplă şi în cazul replicării unor virusuri animale, ca mixovirusurile.

În consecinţă, replicarea viroizilor s-ar face după toate probabilităţile pe o cale autonomă ARN viroidal → ARNc → ARN viroidal progen, controlată de o genă cromosomală a plantei-gazdă (Diener, 1981). Replicarea are loc în nucleul celular şi, ca urmare, infecţiozitatea maximă este asociată cu nucleul şi în special cu cromatina celulelor infectate. Cloroplastele, mitocondriile, ribosomii, ca şi fracţiunea „solubilă" debarasată de nuclei au numai o slabă infecţiozitate, datorită, probabil, contaminării cu resturi de material nuclear.

Patogenitatea viroizilor

Interacţiunea dintre ARN viroidal şi celulele-gazdă pe care le infectează reprezintă un proces biologic la fel de unic ca şi natura viroidului însuşi. Viroizii produc boli grave la unele plante de cultură, şi probabil la animale, însoţite de simptome asemănătoare celor descrise în

cursul infecţiilor virale obişnuite. Ele evoluează frecvent sub forma unor infecţii persistente, în cursul cărora titrul infecţios rămîne constant ridicat de-a lungul unei perioade prelungite de creştere în plantele propagate vegetativ. Această relaţie stabilă şi asociere intimă cu activitatea celulei-gazdă apare ca o formă de evoluţie analogă transformării celulare (Semancik, 1979). În acelaşi timp, existenţa şi replicarea viroizilor în plante-gazdă lipsite de simptome de boală demonstrează posibilitatea sintezei de ARN viroidal, în absenţa unor tulburări fiziologice dramatice. Cele mai obişnuite simptome la plante sînt oprirea în dezvoltare, epinastia şi rugozităţile frunzelor.

Mecanismul de producere a bolii este necunoscut. Plantele infectate nu conţin proteine noi, în raport cu plantele sănătoase, dar prezintă variaţii cantitative foarte importante ale unor proteine normale, ceea ce demonstrează existenţa unor perturbări în reglarea sintezei acestora.

Viroizii, ca atare, nu acţionează ca ARNm în sisteme de sinteză proteică *in vitro* şi nu determină sinteza de proteine specifice viroidale. Incapacitatea viroizilor de a acţiona ca ARNm care să dirijeze sinteza de proteine s-ar explica prin absenţa completă a codonului *AUG* cu semnificaţie de iniţiator, de la care începe „citirea" informaţiei genetice din ARNm. Numai al doilea tip de codon iniţiator *GUG* se găseşte pe ARN viroidal *complementar* format în celula-gazdă. De aceea, teoretic, este posibil ca ARN complementar viroidului să furnizeze informaţia pentru sinteza unei subunităţi a replicazei (echivalentă cu un tetrapeptid), deşi nu există nici o probă experimentală în acest sens. Localizarea şi replicarea nucleară a viroizilor, ca şi incapacitatea lor de a acţiona ca ARNm sugerează că simptomele bolii ar putea fi produse prin interferenţă cu mecanismele de reglare ale activităţii lor celulare (determinînd fie represia unor cistroni în mod normal funcţionali, fie derepresia unor cistroni normal represaţi).

Dealtfel, şi prezenţa infecţiilor inaparente demonstrează că exprimarea puterii patogene a viroizilor ar putea fi datorită mai mult perturbării mecanismelor de reglare a expresiei anumitor gene ale organismului-gazdă, decît exprimării „genelor" proprii ale viroidului în celula infectată.

Semancik (1979), studiind evoluţia infecţiei experimentale la *Gynura aurantiaca* cu viroidul patogen pentru citrice, a demonstrat că apariţia simptomelor de boală şi gravitatea lor se corelează cu acumularea unei proteine cu g.m. mică ($\sim$14 000 dal), căreia nu i s-a putut stabili pînă în prezent nici o proprietate specifică *in vitro* sau *in vivo* şi care pare să provină din alterarea produşilor de metabolism ai celulei-gazdă infectate. Paralel cu aceasta, se observă o scădere pronunţată a conţinutului în gibereline al plantei infectate, corelată cu severitatea răspunsului gazdei la boală. Deoarece acidul giberelic poate regla evenimentele nucleare şi metabolismul unor specii de ARN (sau chiar al tuturor speciilor ARN), replicarea viroizilor şi/sau patogenitatea lor ar putea fi influenţate prin intermediul acestei clase de mediatori hormonali (fig. 95).

Tulburările de creştere care sînt foarte frecvent asociate cu infecţiile viroidale pot fi astfel explicate ca rezultatul unui dezechilibru în activitatea hormonilor de creştere: viroizii prezenţi în nucleul celulelor ar acţiona ca molecule anormale de reglare, care interferă cu cele care asigură în mod normal reglarea genelor ce codifică hormonii de creştere (Semancik, 1979; Diener, 1981).

Transmiterea viroizilor de la o plantă bolnavă la plantele sănătoase se realizează în mod obişnuit pe cale mecanică, probabil prin intermediul nucleilor celulari sau al unor fragmente de cromatină care conţin ARN viroidal. „Supravieţuirea" viroizilor în cursul transmiterii, în absenţa

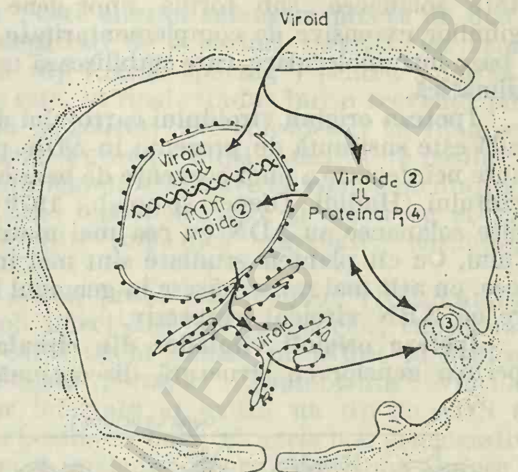


Fig. 95. — Patogenia infecţiilor produse de viroizi. 1. Asocierea viroidului sau ARNc viroidal cu nucleul gazdei (cromatina). 2. Sinteza de ARNc viroidal. 3. Răspunsul citopatogen în sistemul endomembranar. 4. Alterarea constituenţilor specifici gazdei (proteine cu g.m.mică, concentraţia hormonilor endogeni etc.) (după Semancik, 1979).

învelişului proteic (capsidal), este datorată localizării lor intranucleare, la adăpost de atacul enzimatic. Transmiterea lor se mai poate face şi vertical prin polenul sau ovulele plantelor de cartof sau de tomate infectate.

Viroizii nu au specificitate de gazdă. Acelaşi viroid poate infecta plante aparţinînd la specii şi chiar genuri diferite, uneori producînd însă numai infecţii inaparente.

Originea viroizilor

Ipoteza originii virale a fost formulată în două variante:

a) Viroizii ar fi entităţi virale foarte primitive, care nu au ajuns la gradul de complexitate genetică necesară pentru a induce în celula-gazdă reacţiile metabolice noi, de biosinteză, necesare pentru propria lor replicare şi pentru a codifica formarea proteinelor specifice.

b) Viroizii ar reprezenta entităţi virale degenerate, a căror biosinteză a fost iniţial determinată de infecţia celulelor cu ARN viral exogen, faţă de care — la un moment dat — au căpătat o autonomie totală.

Ipoteza originii celulare consideră viroizii entităţi neînrudite cu virusurile, provenind din acizii nucleici ai celulei-gazdă.

a) Viroizii ar putea proveni din transcrierea în ARN a unor gene patologice, care ar deveni funcţionale sub influenţa unor factori încă nedeterminaţi sau ar fi derivaţi dintr-o specie de ARN cu greutate moleculară mică, prezent în nucleu şi nucleol, implicat în mod normal în re-

glarea unor funcţii nucleare şi în transcrierea ARN. Trecerea de la acest ARN de reglare, constituent normal al celulei, la viroid (ARN „anormal" şi patogen) s-ar face fie prin mutaţie, fie prin transfer întîmplător la o gazdă străină sensibilă în care începe să fie replicat.

b) După altă ipoteză, viroizii ar proveni din genomul normal al unor plante solanacee, sub forma unor gene devenite libere, care, datorită regiunilor extensive de complementaritate, suferă numeroase împerecheri de baze intramoleculare, care stabilizează molecula scăpînd-o de degradarea enzimatică.

Ipoteza originii viroidului cartofului din materialul genetic al celulei-gazdă este susţinută de prezenţa în ADN provenit de la diferite specii de plante neinfectate a unor secvenţe de baze complementare faţă de viroidul cartofului (Hadidi, Diener şi colab., 1979). Printre speciile testate, mai multe solanacee au ADN cu cea mai mare afinitate pentru viroidul cartofului. Cu cît plantele studiate sînt mai îndepărtate filogenetic de solanacee, cu atît mai rar se găsesc în genomul lor secvenţe ADN complementare cu ARN viroidal respectiv.

Ipoteza originii viroizilor din circularizarea intronilor. După descoperirea genelor cu structură discontinuă*) s-a emis ipoteza că viroizii

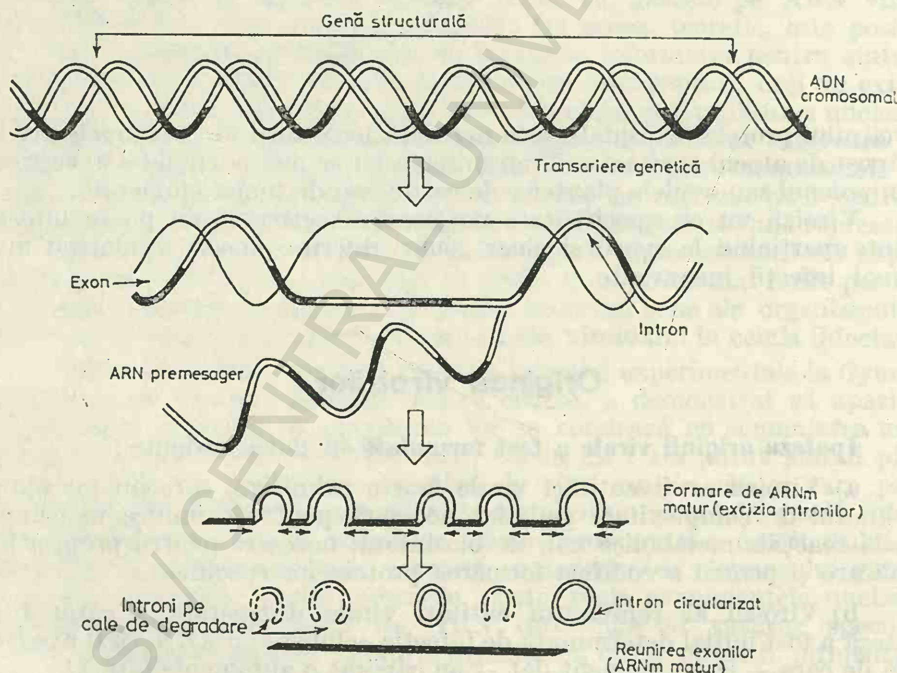


Fig. 96. — Reprezentarea schematică a ipotezei privind originea viroizilor din secvenţele de ADN fără rol de codificare (introni), care scapă de degradarea enzimatică după eliminarea lor din ARN premesager.

ar putea proveni din circularizarea intronilor după îndepărtarea lor din molecula de ADN transcrisă de pe matriţa de ADN. Gilbert (1978) a

---

*) **Problema va fi tratată în detaliu în vol. II.**

demonstrat că genele celulelor eucariote, ca și ale virusurilor animale sînt formate din segmente cu *rol de codificare* („exoni"), care sînt separate prin regiuni „tăcute" („intronii")necodificatoare, respectiv fără informație genetică, cu un rol definit. În cursul procesului de biosinteză a proteinelor, întreaga genă (intronii + exonii) este transcrisă la o moleculă mare de „ARN premesager", care ulterior suferă un proces de maturare, prin care intronii sînt îndepărtați de o enzimă specială, iar exonii sînt lipiți sau „înnădiți" cap la cap („gene splicing") pentru a forma o moleculă de ARNm matur care este, în final, tradus într-o secvență polipeptidică (fig. 96). Deși intronii în general sînt considerați ca fiind secvențe „non sens", care ar fi rapid degradate după excizie, este posibil ca atunci cînd secvențele lor prezintă regiuni extensive de complementaritate să se producă împerecheri de baze intramoleculare și odată cu aceasta circularizarea moleculei, procese care împiedică degradarea enzimatică (Diener, 1980).

Deși pînă în prezent nu există probe concludente, viroizii au fost implicați în patogenia unor boli infecțioase ale animalelor, considerate ca fiind de origine virală, al căror agent cauzal nu a fost identificat. Între acestea, ar putea fi incluse boala „Scrapie" („tramblanta" ovinelor), deoarece în creierul animalelor infectate ar exista un tip de ADN cu g.m. mică, esențial pentru infecțiozitatea bolii, și unele boli degenerative ale sistemului nervos central uman (maladia „Kuru" din Noua Guinee și sindromul Jakob-Creutzfeld atribuite anterior *virusurilor „lente"* ai căror agenți patogeni nu au fost identificați). Nu este exclusă și existența unor viroizi formați din ADN.

Bacteriofagii

(Pl. 26–36)

Bacteriofagii sînt virusuri adaptate la parazitismul în celule bacteriene şi care, prin multiplicare, produc liza acestora. Fenomenul de „liză transmisibilă" a fost descoperit de Twort (1915) şi atribuit ipotetic unei etape din ciclul de viaţă al bacteriilor, producerii unei enzime cu rol litic sau unui virus. Aceste explicaţii se bazau pe imposibilitatea cultivării agentului litic pe medii de cultură, trecerea lui prin filtrele bacteriene şi posibilitatea de a-l inactiva prin încălzire o oră la 60°C. D'Hérelle (1917), care descoperă fenomenul independent, demonstrează natura particulată a fagului şi îl consideră ca virus, dîndu-i denumirea de *bacteriofag* (mîncător de bacterii) sau prescurtat *fag*.

După 1940, odată cu înfiinţarea „grupului fag" de cercetători, condus de Delbrück, sistemul bacteriofag—bacterie a fost folosit ca model experimental pentru cele mai importante studii de genetică moleculară (replicarea acizilor nucleici, transcrierea şi traducerea informaţiei genetice, mecanismele mutagenezei, reglarea activităţilor celulare, oncogeneză etc.).

Structura fagilor este diferită de la un grup la altul. Unii fagi au forma unor mici capside icozaedrice (Φ X 174, MS2), în timp ce alţii sînt filamentoşi (fI) şi au o simetrie helicală (fig. 97).

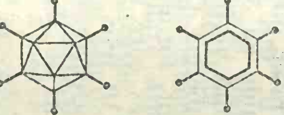
Fagii mai mari, din *seria T* (engl. „Type"), au un cap, reprezentat de o capsidă cu contur hexagonal care închide genomul şi pot avea o coadă care serveşte ca organ de legare de bacterii şi pentru transferul ADN în celula-gazdă. Complexitatea cozii variază de la un fag la altul, putînd fi scurtă (T3, T7), lungă şi flexibilă, necontractilă, cu sau fără un buton sau un croşet la capătul distal (T1, λ), sau ca o structură complicată, contractilă (T4). Unele particule fagice pot fi acoperite de un înveliş suplimentar (PM2 de la *Pseudomonas*).

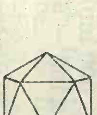
Cele mai multe date privind structura fagilor se referă la fagii din seria T ai *E. coli*, în special la grupul T-par (*T2*, *T4*, *T6*), care include fagi similari ca structură, proprietăţi antigenice şi genetice, şi la fagul λ.

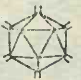
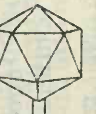
Anatomia moleculară a fagilor T-par

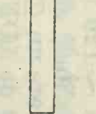
(Pl. 26, 27)

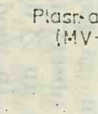
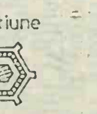
Particula virală matură a fagilor T-par cu g.m. $2{,}2 \cdot 10^8$ şi volum de ~1 :1000, faţă de cel al bacteriei-gazdă, este alcătuită din ADN şi proteine.

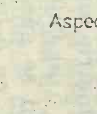




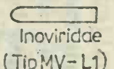


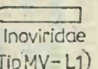








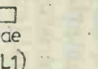


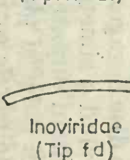
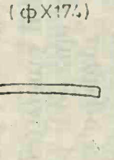
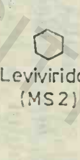





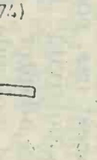
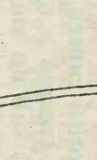
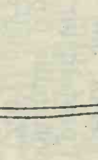






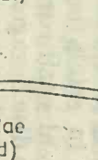
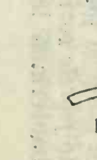



Fig. 97. — Principalele familii de bacteriofagi (după Matthews, 1979).

Capul fagului T4 apare la microscopul electronic cu o formă poliedrică, iar pe secțiuni cu un contur hexagonal. El are o lungime de 100 nm, o lățime de 65 nm și g.m. ~ $8{,}5 \cdot 10^6$. Forma sa geometrică exactă nu este cunoscută, deoarece capsomerele nu pot fi observate în capul fagic intact, ci numai după degradarea acestuia. Ele au ∅ de 5,0 nm (6,2 S), dar numărul și așezarea lor nu sînt cunoscute. În mod obișnuit, pe baza umbrelor formate de virioni pe microelectronografii capul fagului T4 este descris ca o *prismă hexagonală bipiramidală* (Williams și Fraser, 1956). După Bradley (1967), forma capului fagic ar corespunde, probabil, unei structuri geometrice derivată din modelul lui Williams și Fraser, obținută prin distorsiune, ca rezultat al rotației celor două piramide cu 30°, în raport una cu cealaltă. Ar rezulta o figură geometrică numită *antiprismă hexagonală bipiramidală*. În sfîrșit, după Moody și Kellenberger (1967), forma capului la fagul T4 este aceea de icozaedru alungit, format din două piramide ale unui icozaedru (fiecare avînd un vertex care unește cinci fațete) separate de două benzi ecuatoriale cu cîte 10 fețe, tăiate dintr-un icozaedru, în loc de o singură bandă obișnuită. Astfel construită, spre deosebire de icozaedrul propriu-zis, care are trei tipuri de simetrie (5 :3 :2), capsida alungită a fagului are numai două (5 :2).

În acest caz, coada fagului cu o simetrie rotațională de tip 6 nu poate fi „potrivită" la axul de simetrie 5 al capului decît în prezența unei „plăci adaptor". În interiorul capului se găsește genomul fagic sub forma unei molecule de ADN d.c. lineară, cu o lungime de 50 μm (g.m. $1{,}2 \cdot 10^7$), suficientă pentru a cuprinde ~ 200 gene, „împachetată" foarte strîns.

Datorită ruperii unor interacțiuni puternice între ADN și proteine în ultima treaptă a maturării fagului (Hohn, 1973), genomul s-ar găsi în capsidă sub un anumit fel de presiune suficientă pentru a determina la momentul potrivit injectarea lui în celula bacteriană (Zarybnicky, 1973; Showe, 1975). În afară de ADN, capul fagului mai conține o *proteină internă*, 300—1 000 molecule cu g.m. mică (reprezentînd 1 % din totalul proteinelor fagice), un polipeptid acid (1 000 — 3 000 molecule) și două poliamine (spermidină — 3 400 molecule și putrescină — 62 000) molecule) (Zarybnicky, 1973).

Capul fagului este legat cu gîtul cozii la apexul uneia dintre piramide, la nivelul căreia există un mic „dop" proteic care ar putea juca rolul de „adaptor de simetrie" (Moody, 1976) sau de articulare mecanică pentru a fixa capul de coadă. Între acest „dop" și placa bazală a cozii de care este legat se găsește un tub lung de ~ 120 nm — *corpul central al cozii* sau *cilindrul axial* alcătuit din 24 de inele suprapuse, fiecare avînd 6 subunități proteice cu g.m. ~ 20 000. El are un ∅ de 7,5 nm și un canal central cu ∅ de 2,0 nm, care este străbătut de ADN în momentul introducerii sale în celula bacteriană. În jurul său este asamblat mecanismul contractil al cozii care are mai mulți constituenți. Imediat sub cap se găsește un disc hexagonal (cu ∅ 3,6 nm) numit *gulerul* fagului, gros de numai 1,5 nm, avînd o simetrie radială de tip 6 și alcătuit din 5 subunități goale pe dinăuntru, situate la apexurile hexagonului.

Între guler și placa bazală se găsește o rețea de fibrile foarte fine formată de *fibrele cozii*. În condiții adecvate pentru adsorbția fagului pe o celulă bacteriană legătura dintre fibrele cozii și guler se desface, ele

rămînînd legate de placa bazală. În felul acesta „gulerul'' ar juca un anumit rol în procesul de fixare al particulei fagice, deși acest proces se petrece la distanță de el.

În interiorul „rețelei'' de fibre se găsește *teaca contractilă* a cozii. În stare extinsă (înainte de adsorbție și infecție) are forma unui cilindru gol, lung de 80,0 nm, cu ∅ 16,0 nm, alcătuit din 144 subunități morfologice (∅ 3 nm), g.m. 80 000 dal, aranjate sub forma a 24 de inele suprapuse, de 6 subunități fiecare *(simetrie radială de tip 6)*. Unele inele sînt mai albe decît celelalte și formează, datorită aranjamentului capsomerelor „în șurub'', o helice. Cînd se contractă, teaca se scurtează aproximativ la jumătate, respectiv la 35 nm, cu un ∅ de 25 nm. În stare contractată este alcătuită tot din 24 de inele, de 6 subunități, dar cu inelele mult mai apropiate unele de altele și cu subunitățile deplasate la o distanță (rază) mai mare (Amos și Klug, 1975 ; Moody, 1976). Dacă înainte de contracție, subunitățile tecii erau numai slab legate unele de altele, după contracție sînt atît de strîns legate încît nu pot fi disociate decît cu agenți denaturanți foarte puternici (To și colab., 1969 ; Poglazov, 1973).

Placa bazală are, de asemenea, aspectul unui disc hexagonal cu ∅ 40 nm, alcătuită din cel puțin 15 tipuri de proteine diferite. Ea are o simetrie radială de tip 6 și este alcătuită dintr-un „dop'' central obturator („axul plăcii'') înconjurată de o structură care îl leagă prin intermediul a șase „punți'' cu unghiurile unui cadru extern, ca o ramă, de asemenea hexagonală (Kikuchi și King, 1976). În momentul contracției, placa bazală ia formă de stea, cu ∅ mărit la 60,0 nm și este lipsită de „dopul'' central (Crowther, 1977). Placa este prevăzută cu 6 *cîrlige (croșetele cozii)* vizibile atunci cînd placa este examinată din profil, dispuse cîte unul la fiecare apex. Cîrligele sînt probabil unități integrale de fixare a fagului pe bacterie (Cota-Robles, 1968).

Fibrele cozii sînt structuri filamentoase proteice lungi de 130 nm, cu ∅ 2,0 nm, alcătuite probabil din 4 subunități identice. Ele sînt fixate, pe de o parte, pe placa bazală, iar pe de altă parte, prin extremitatea lor distală, legată mai slab de subunitățile apicale ale gulerului, formează rețeaua de fibre numită „învelișul extern'' al cozii (Daems, 1961) în jurul tecii contractile. În perioada premergătoare fixării, fibrele se desprind de inserția lor pe „guler''și rămîn legate numai de placă, „înotînd'' libere în mediu și avînd aspectul unor picioare de păianjen.

Structura și topologia genomului fagilor

Cu excepția fagului Φ 6 de la *Pseudomonas phaseolus*, care are un genom ARN segmentat, format din 3 fragmente cu g.m. $2,2.10^6$, $2,8.10^6$, respectiv $4,5.10^6$, toți fagii descriși pînă în prezent au genomul format dintr-o singură moleculă de acid nucleic.

Fagii cei mai mici ARN „masculi'' (Qβ, MS2 și f2) au un genom ARN m.c. (g.m. 1.10^6 dal) echivalent cu $3,5.10^3$ baze și cu structură lineară în sensul că în mod natural extremitățile 3′ și 5′ sînt libere. Ei prezintă frecvent un grad ridicat de structură secundară, deoarece

60—80 % din baze sînt legate prin legături de H, formînd structuri în „ac de păr".

Fagii icozaedrici mici (Φ X 174) și cei filamentoși (F1, fd, M13) au genom ADN m.c., cu g.m. 1.6 $\times 10^6$ dal, respectiv $\sim 5,5.10^3$ baze și o structură circulară.

Fagii cu genom ADN d.c. (λ, Φ80, P2), fagii T-par (T2, T4 etc.) și T-impar (T1, T3, T7 etc.) au un genom linear care se deosebește însă sub raportul structurii secvențelor terminale ale genomului.

Fagii λ, Φ80, P2, avînd genomul ADN d.c. linear, se termină la ambele extremități cu secvențe monocatenare, complementare unele față de altele, formînd așa-numitele capete *aderente*, *coezive* sau „lipicioase" („cohesive end", „sticky end"). Datorită lor, genomul λ, spre exemplu, are potențialul de a se circulariza prin legarea „capătului" genomului cu „coada" lui și, de asemenea, ca un capăt al genomului λ să hibrideze cu capătul complementar al altei molecule pentru a forma dimeri sau multimeri superiori, care la rîndul lor se pot circulariza (Ris și Chandler, 1963). Aceasta înseamnă că extremitățile stîngă și dreaptă ale unei molecule de ADN λ sînt identice cu extremitățile stîngi și drepte ale tuturor celorlalte genomuri. De aceea, secvența completă a bazelor citită de la stînga la dreapta este aceeași la toate moleculele (Hognes, 1966).

Fagii T1, T2, T3, T4, T7 etc. au genomul alcătuit din ADN d.c. linear caracterizat însă prin prezența unor secvențe de nucleotide repetate terminal. Lungimea secvențelor repetate terminal variază de la un fag la altul, dar este constantă pentru un tip de fag dat: $\sim$ 250 de baze la fiecare capăt al ADN la fagul T7 $>$($\sim$ 0,7% din lungimea genomului), $\sim$ 10 000 de baze la fagul T5 (90 % din genom).

Fagii T4. Spre deosebire de fagii T1, T3, T5, T7 (T-impar), la care toate moleculele de ADN genomic au același aranjament de gene unic, de-a lungul genomului și aceleași secvențe repetate terminale, la fagul T4, secvența nucleotidelor este aranjată într-o serie de permutări circulare (Thomas și Mac Hattie, 1964; Rhoades, 1966); secvența nucleotidelor în unele molecule este ABCD...WXYZAB, în altele, CDE...WXYZABCD, iar în altele EF.....WXYZABCDEF. Cu alte cuvinte, toate moleculele de ADN λ au același conținut genetic (conțin aceleași secvențe de nucleotide), dar secvențele inițiale ale genomului diferă de la un genom individual la altul și cîteva nucleotide din ele sînt repetate la extremitatea opusă a genomului. Această situație este determinată de faptul că replicarea are loc pe calea unei structuri multicromosomale care poate fi reprezentată prin secvența ABCDE.....WXYZABCD...WXYZABCDE.......WXYZABCD......, care este apoi tăiată la întîmplare pentru a forma molecule („headful") identice ca lungime, corespunzătoare genomului fagic matur, care poate fi încapsidat. Datorită acestui mecanism, o mică secvență care într-un genom este în mijlocul moleculei de ADN poate să apară în al doilea aproape de capătul stîng, iar în al treilea aproape de capătul drept (fig. 103).

Baze nucleice neobișnuite. În afară de aceste particularități structurale, spre deosebire de genomurile virusurilor animale care conțin numai

baze normale (A, T, C, G, U) genomurile fagice conţin frecvent baze nucleice neobişnuite ca 5-hidroximetilcitozină-(5HMC), în loc de citozină (fagii T-par), sau 5-hidroximetiluracil şi 5-4,5,-dihidroxipentiluracil (fagii *B. subtilis*), uneori glucozilate cu 1 sau 2 resturi de glucoză pe calea unor legături α sau β.

Semnificaţia biologică a bazelor neobişnuite nu este bine stabilită. Funcţia lor ar fi aceea de a proteja ADN fagic de acţiunea unei enzime virale (nuclează), care atacă numai ADN străin şi în felul acesta poate degrada selectiv cromosomul bacterian în cursul sintezei de virus.

Infecţia celulei bacteriene. Replicarea bacteriofagului

(Pl. 28–31)

Cînd o suspensie de fagi este amestecată cu o suspensie de bacterii sensibile, particulele fagice se fixează pe suprafaţa gazdei lor bacteriene şi îi injectează acidul lor nucleic. Ajuns în interiorul celulei, genomul fagic deviază metabolismul normal al gazdei de la sinteza propriilor constituenţi, în vederea sintezei de constituenţi fagici şi formarea de particule virale progene. Acest ciclu de multiplicare vegetativă este urmat, de regulă, de liza celulei bacteriene şi de eliberarea unui număr mare de particule fagice infecţioase.

O alternativă a acestei evoluţii — caracteristică fagilor temperaţi — corespunde *fenomenului de lizogenie* în cursul căruia genomul viral se integrează în structura cromosomului bacteriei-gazdă, devenind parte integrantă a acestuia şi comportîndu-se asemenea unor gene cromosomale.

Schematic, ciclul de replicare vegetativă a fagului *(infecţia productivă)* are următoarele etape:

Adsorbţia reprezintă procesul de fixare a particulelor virale pe suprafaţa bacteriilor. După o serie de ciocniri întîmplătoare, fagul vine în contact cu bacteria, prin intermediul fibrelor cozii, în faza de fixare iniţială. Frecvenţa coliziunilor între fagi şi bacterii depinde mai ales de concentraţia lor relativă. În condiţiile de lucru uzuale, cu o concentraţie de 10^8 bacterii şi 10^7–10^9 virioni/ml, în cîteva minute sînt adsorbiţi 90% din virioni.

Faza iniţială de fixare este reversibilă şi relativ lipsită de specificitate, dar pregăteşte faza specifică ireversibilă a fixării, realizată de extremitatea cozii prin intermediul plăcii bazale, care amorsează mecanismele de injectare.

La fagii T-par, un rol esenţial în fixare l-ar juca „croşetele" plăcii bazale, întrucît distanţa dintre placă şi peretele celular nu este niciodată mai mică de 5 nm. Formarea legăturilor între fagi şi bacterii depinde de prezenţa unor structuri chimice complementare numite *receptori de fag.*

Receptorii de fag. Practic, aproape orice structură existentă la suprafaţa celulei bacteriene sau în prelungirea acesteia (pili şi flageli) poate include sau acţiona ca receptori de fagi (Lindberg, 1973). Sinteza lor este controlată de gene bacteriene şi poate fi anulată prin mutaţie. Receptorii

de fag au fost evidențiați pe membrana externă a peretelui celular și stratul capsular la bacteriile Gram-negative și pe peretele celular la bacteriile Gram-pozitive, pe flageli și pili. La rîndul lor, fagii sînt prevăzuți cu structuri de legare situate la nivelul plăcii bazale a cozii (fagii T2, T4 etc.), la nivelul uneia dintre extremități (fagul f1) sau pe suprafața virionului (Φ X 174, MS2 etc.).

Au fost descrise trei mecanisme principale de legare a fagilor de suprafața bacteriei-gazdă ;

1) Fagii mari ADN recunosc situsurile de legare și se fixează reversibil cu ajutorul fibrelor cozii pe lanțurile lipopolizaharidice ale bacteriilor Gram-negative (fagii T-par) sau de complexele de acizi teichoici legate covalent de peptidoglican la cele Gram-pozitive (fagii de stafilococ și *B. subtilis*). Fixarea ireversibilă are loc prin interacțiunea dintre croșetele plăcii bazale și receptori. Rolul esențial al croșetelor în fixare este demonstrat și de faptul că distanța dintre placa bazală a fagului și peretele celular nu este niciodată mai mică de 5 nm (înălțimea croșetelor la fagii T-par).

2) Al doilea mecanism descris la fagii cu coadă necontractilă constă în legarea de receptorii lipopolizaharidici, urmată de degradarea parțială a acestora sub acțiunea unei endoglicozidaze virale. Deși de regulă capsula blochează accesul fagilor la structurile subiacente, unii fagi se leagă de receptorii de pe această structură și infectează celula-gazdă după degradarea ei parțială.

3) Fagii izometrici ARN, fagii filamentoși și cei flagelotropi (X 1 la *Salmonella*, PBS1 etc.) se fixează prin intermediul *proteinei A* (de atașare), care apoi intră în celulă împreună cu acidul nucleic.

Injectarea genomului viral în celula bacteriană. Capsida fagului are rolul de a proteja ADN și de a-l introduce în celula bacteriană. Exceptînd unii din constituenții ei minori, care pătrund în bacterie odată cu ADN, capsida, ca formație structurală, rămîne în întregime la exterior (Hershey și Chase, 1952), putînd fi asemănată cu o microseringă adaptată ca după fixarea pe celula bacteriană să-și inoculeze conținutul în interiorul acesteia. După adsorbție, conformația plăcii cozii — care este o structură complexă, formată din ~ 12 polipeptide definite — este modificată, probabil ca urmare a interacțiunii unuia din componenții săi — enzima *dihidroxifosfatreductaza* — cu piridinnucleotidele (ca NADPH), care temporar se eliberează din celula bacteriană ca răspuns la infecție. Această schimbare de conformație a plăcii bazale amorsează o modificare în modul de aranjare a subunităților care constituie teaca cozii. Ca urmare, teaca cozii se contractă și se scurtează, introducînd corpul central al cozii (cilindrul axial) în peretele celular pe o lungime de ~ 12 nm.

Contracția tecii, amorsată de eliberarea legăturilor — SH survenită în faza anterioară, forțează probabil cilindrul axial să pătrundă prin leziunea peretelui celular și, în final, ADN din „capul" fagului trece în celulă pe calea cilindrului axial tubular. După unii autori, cilindrul axial ar fi mai curînd un „dop", pe care contracția tecii l-ar elibera, trecerea ADN făcîndu-se direct prin teacă. În această fază, pe lîngă ADN trec în celulă și mici cantități de proteine, oligopeptide bazice și poliamine, reprezentînd probabil fragmente de proteine fagice legate ionic de ADN.

Mecanismul injectării genomului este neclar, majoritatea ipotezelor formulate pe baza unor date teoretice sau a unor modele experimentale ducînd la concluzia că injectarea unei molecule de ADN prin canalul cozii fagului ar trebui să dureze mai multe ore — ceea ce este în dezacord cu durata normală de 15 secunde la fagul T4 — situaţie care sugerează intervenţia unor forţe de propulsie foarte puternice. Natura forţelor care asigură „împingerea" ADN prin coada fagului este, de asemenea, necunoscută.

În opoziţie cu Bradley (1967), care, pe baza unor date teoretice, consideră că ADN fagic ar fi „împachetat" lax şi ar ocupa numai 47 % din volumul capului, cei mai mulţi autori sînt de părere că ADN ar fi foarte pliat şi „împachetat" foarte strîns, ceea ce l-ar pune sub o presiune considerabilă (Stent, 1956), la care s-ar adăuga presiunea produsă de agitaţia termică a moleculelor mari (poliamine, polipeptide, proteina internă) în interiorul capului fagic (Zarybnicky, 1973). Datorită acestei presiuni, în momentul contracţiei cozii şi al „scoaterii dopului" care o închidea, ADN ar fi propulsat energic în celula bacteriană. După o altă ipoteză, pătrunderea ADN în bacteria-gazdă ar fi datorată mişcării browniene lineare a ADN însuşi şi mişcării indusă de agitaţia termică a părţii din ADN intrată în celula bacteriană (Pollard, 1959). Rolul celulei-gazdă în acest proces pare să fie pasiv, deşi după unele date transferul integral al ADN fagic ar necesita sinteza de proteine bacteriene.

Unii acizi nucleici fagici trec în celulă numai însoţiţi de anumite „proteine-pilot". În aceste cazuri (fagul *B. subtilis*), deplasarea transmembranară a ADN fagic este controlată de interacţiunea dintre proteinele-pilot şi receptorii de membrană (Tomasz, 1978).

Procesele intracelulare induse de prezenţa genomului fagic. Infecţia bacteriilor cu fagi determină o reorganizare profundă a activităţii fiziologice bacteriene, care duce în final la subordonarea întregii „maşinării" metabolice bacteriene producerii de constituenţi virali. În unele cazuri, simpla legare a fagilor de receptorii celulari bacterieni (anterior injectării ADN viral) blochează toate sintezele celulare normale printr-un mecanism încă obscur, probabil similar celui al acţiunii unor colicine (Pereira da Silva, 1967).

Introducerea genomului fagic în bacteria receptivă *(fag vegetativ)* declanşează o serie de procese care includ sinteza a numeroase proteine fagice într-o succesiune temporală fixă şi caracteristică, replicarea genomului etc., care se desfăşoară perfect reglat, dirijate spre sinteza de particule fagice infecţioase progene.

Genele fagice nu încep să lucreze toate deodată, ci numai după un program bine coordonat. Unele proteine virale apar imediat după infecţie (proteinele „timpurii"), în timp ce altele numai după ce a trecut jumătate din ciclul de creştere (proteinele „tardive"). În plus, unele încep să acţioneze imediat şi îşi menţin activitatea în tot timpul infecţiei virale, în timp ce altele funcţionează numai cîteva minute, după care se opresc (fig. 98).

Proteinele virale precoce sînt de mai multe tipuri.

1. *Proteinele de membrană.* Infecţia fagică face învelişurile celulare mai permeabile, ceea ce ar putea duce la o pierdere excesivă de consti-

tuenţi celulari şi la liză cu oprirea multiplicării fagului. Proteinele de membrană au capacitatea de a „astupa" găurile produse de cozile fagilor, ceea ce restabileşte gradul de permeabilitate anterior infecţiei. Ele sînt încorporate în membrana celulară şi stimulează sinteza de perete celular nou sub controlul unor gene virale „spackle".

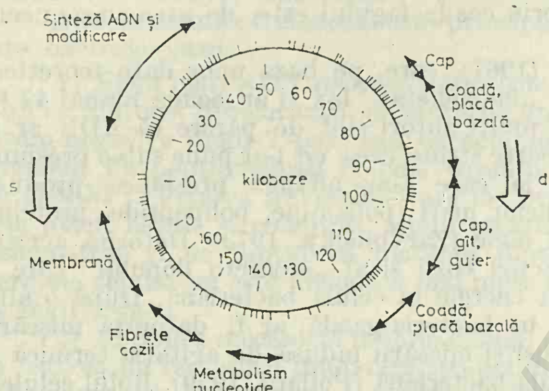


Fig. 98. — Harta genetică a fagului T4. Cercul intern este calibrat în kilobaze (1 000 perechi de nucleotide). Săgeţile ↔ delimitează regiuni ale genomului cu funcţii particulare, iar cele duble indică sensul transcrierii celor două catene, stîngă (s) şi dreaptă (d), ale ADN, care poartă genele precoce şi tardive. Harta genetică este circulară (deşi ADN T4 este linear) datorită permutării circulare a genelor în cromosomul viral.

2. *Proteinele care degradează enzimatic cromosomul bacteriei-gazdă*. Imediat după infecţia celulei bacteriene, genomul fagic asigură sinteza unor proteine care, determinînd modificarea factorului σ din celula-gazdă, împiedică legarea lui de ARN-polimerază şi blochează în mod specific transcrierea la ARNm a informaţiei genetice a gazdei. Cum ARNm bacterian are viaţa scurtă, imediat după degradarea sa sinteza proteinelor bacteriene încetează, iar ribosomii sînt eliberaţi devenind disponibili pentru ARNm fagic. De asemenea, încetează şi sinteza de ADN şi ARN bacterian.

Proteinele care degradează ADN-gazdă intră în acţiune determinînd degradarea cromosomului în fragmente de ~1/10 din mărimea sa, apoi producerea de breşe monocatenare (prin acţiunea endonucleazei II) care sînt „lărgite" prin acţiunea exonucleazelor (fig. 99). Acestea determină

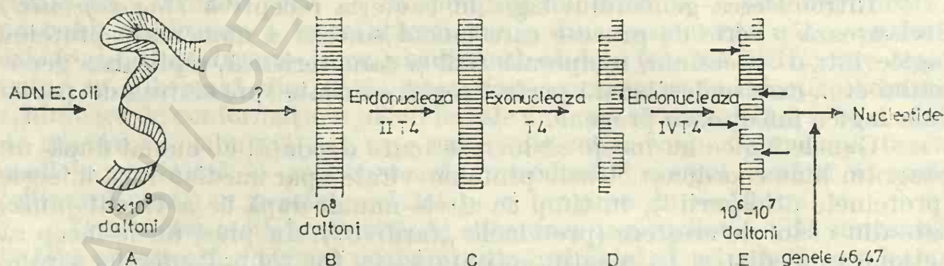


Fig. 99. — Fazele degradării ADN cromosomal de *E. coli* după infecţie cu fagul T4. O enzimă încă neidentificată degradează ADN *E. coli* (A) la fragmente de mărimea ~1/10 din cea iniţială (B), în care endonucleaza II T4 produce breşe monocatenare (C), care sînt lărgite de exonucleaza T4. Segmentele monocatenare produse sînt clivate de endonucleaza IV T4. Rezultă segmente de ADN d.c. ceva mai mari de 1/100 din mărimea genomului originar. Degradarea lor ulterioară la nucleotide este asigurată de produşii genelor 46 şi 47.

expunerea unor benzi monocatenare, clivate la rîndul lor de endonucleaza IV. Se formează astfel mici segmente de ADN d.h., mai mici de 1/100 din cromosomul originar, care sînt în continuare degradate la nucleotide de enzimele virale produse de genele 46 şi 47 (Warner şi colab., 1970). Se formează un stoc (pool) de nucleotide intracelular din care cel puţin 1/3 ar fi utilizate la formarea de fagi progeni.

3. *Sinteza precursorilor ADN fagic.* Fagul T4 conţine 5-hidroximetil-citozină din care unele molecule poartă resturi adiţionale de glucoză. Cel puţin trei enzime (proteine precoce) participă la formarea 5HMC glucozilate, asigurînd un randament sporit al producerii de fag progen, protejînd, probabil în acelaşi timp, ADN fagic de acţiunea nucleazelor destinate să degradeze ADN bacterian.

4. *Proteinele care programează transcrierea ADN fagic.* În raport cu momentul producerii lor în cursul ciclului de multiplicare virală există trei categorii principale de ARNm: timpuriu, mijlociu şi tardiv. În timp ce programul timpuriu este efectuat de ARN-polimeraza bacteriană, programul mijlociu şi cel tardiv sînt controlate de o serie de proteine fagice care modifică ARN-polimeraza gazdei, prin introducerea în structura ei a unor factori de specificitate care înlocuiesc factorul bacterian σ prin adenilarea subunităţii α sau clivarea proteolitică de mici porţiuni din subunităţile β şi β' (Ritchie, 1977).

Spre deosebire de fagii T-par, fagul T7 codifică sinteza unei ARN-polimeraze specific virală, care transcrie mai eficient ADN fagic decît ADN bacterian.

5. *Enzimele care participă la replicarea ADN.* La scurt timp după infecţie intră în acţiune, pentru 12 minute, genele care codifică „enzimele esenţiale ale metabolismului ADN fagic": a) *ADN-polimeraza*; b) *polinucleotid-ligaza*; c) *nucleazele* şi d) *derulaza* („unwinding enzyme").

Replicarea genomului fagic T4. Mecanismul replicării ADN fagic este foarte complex. ADN fagic se replică semiconservativ, nu prin efectuarea de copii identice repetate ale genomului infectant originar, ci pe calea formării unui intermediar de replicare cu lungime considerabil mai mare decît genomul însuşi („intermediar cromosomal"). Acesta formează în celulă un „pool" din care moleculele individuale sînt luate la întîmplare în cursul morfogenezei şi încapsidate după ce au fost convertite în forme mature, identice ca lungime cu molecula parentală (fig. 100, 101).

Replicarea ADN fagic este în mare măsură dependentă de unele funcţii ale celulei-gazdă. Ea necesită o serie de proteine şi factori esenţiali codificaţi de celula-gazdă. În plus, genomul fagic este legat de membrana plasmatică şi rămîne legat de aceasta printr-un mecanism necunoscut, în tot timpul replicării.

Aproximativ 20 de gene din genomul T4 sînt implicate în sinteza ADN, multe dintre ele cu funcţii necunoscute (Ritchie, 1975).

Proteinele virale tardive. Sinteza proteinelor tardive devine predominantă după $\sim$ 20 minute cînd ADN a ajuns la rata maximă de replicare şi transcrierea genelor timpurii este stopată. Peste 80 % din ARNm

tardiv este transcris în sensul acelor unui ceasornic de pe catena „r" a ADN din genomurile progene rezultate din replicare. Restul de 20% este transcris complementar față de catena „l" în sens antiorar. Produșii genelor tardive sînt grupați în trei categorii distincte:

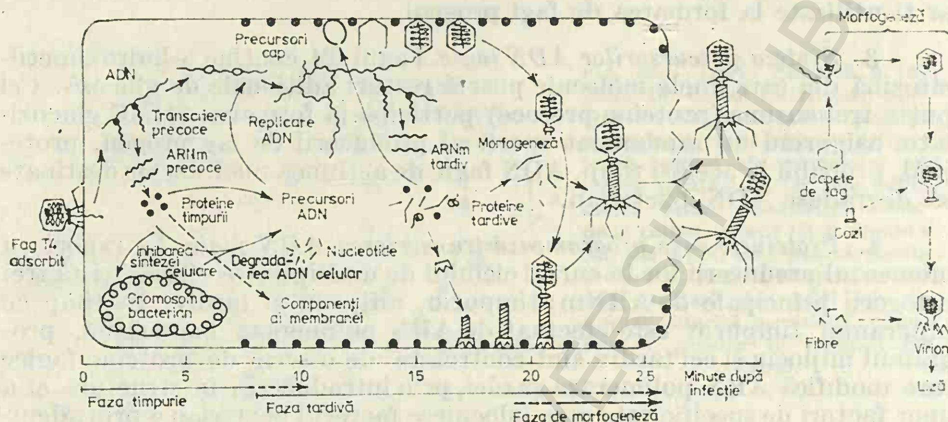


Fig. 100. — Reprezentarea schematică a etapelor replicării fagului T4.

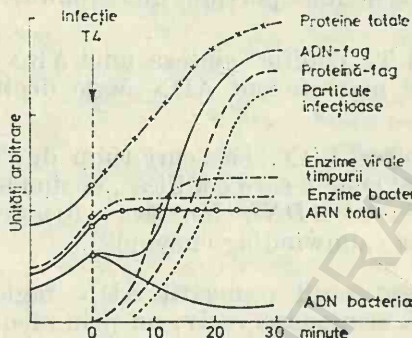


Fig. 101. — Evoluția proceselor de biosinteză într-o celulă de *E. coli* după infecția cu fagul T4. Infecția fagică este urmată de oprirea rapidă a sintezelor celulare (ADN, ARN și proteine) și înlocuită de sinteza constituenților virali (după Luria și colab., 1978).

1) *Proteinele structurale ale fagului*, care includ cel puțin 30 de specii diferite de proteine la fagul T4 (dar numai 10—15 la fagii T7 și λ, mai simpli).

2) *Proteinele active în procesul de morfogeneză*, incluzînd produșii a cel puțin 17 gene diferite la fagul T4. Genele pentru proteinele cozii sînt grupate în structura genomului în trei situsuri diferite, în raport cu cantitatea produșilor respectivi, necesară pentru o asamblare cît mai eficientă.

3) *Enzimele necesare pentru liza celulei bacteriene* includ o lipază care atacă membrana plasmatică a celulei, oprind activitatea metabolică a gazdei, și lizozimul care hidrolizează peretele celular.

Reglarea biosintezei constituenților fagici. Biosinteza proteinelor fagice se face într-o secvență strict ordonată și în cantități corespunzătoare în acord cu nevoile ciclului de multiplicare. Sisteme de control foarte complexe și încă puțin cunoscute fac ca anumite proteine să apară exact cînd este nevoie de ele: spre exemplu, enzimele necesare pentru a

devia sintezele celulare de la genele gazdei la cele virale sînt necesare imediat după infecţie, în timp ce proteinele structurale de capsidă şi cele care produc liza bacteriană sînt necesare tardiv. Dacă lizozimul ar fi produs precoce, ar liza bacteriile înainte de replicarea fagului.

În funcţie de aceste nevoi au fost descrise la fagul T4 trei categorii de ARNm raportat la perioada caracteristică a transcrierii lor în cursul ciclului de multiplicare virală : *timpuriu*, *de mijloc* şi *tardiv*, uneori subîmpărţite în subclase (*imediat precoce*, *timpuriu întîrziat*, *cvasitardiv* ş.a.m.d.).

O primă modalitate de reglare decurge din însăşi ordinea genelor în cromosomul fagic. În condiţii optime de creştere, timpul necesar pentru transcrierea unei molecule de ARNm cu g.m. ~ 2 milioane ($\sim 6\,000$ nucleotide) este de ordinul a 3—4 minute, deci în ritmul de cca 30/secundă. Moleculele cu aceste dimensiuni codifică 4—5 proteine cu dimensiuni medii, a căror sinteză însă nu începe în acelaşi timp. Proteinele codificate la capătul 5′ al moleculei pot fi complet traduse înainte ca transcrierea genei de la capătul 3′ să fi început (Watson, 1977). În general, genele care trebuie să intre în acţiune timpuriu au tendinţa de a se localiza la începutul operonilor, în timp ce acelea care funcţionează la 3—4 minute de la infecţia virală îşi au locul spre capătul 3′ al unor operoni suficient de mari. Acest mecanism singur nu poate explica succesiunea sintezelor induse de fagul T4, deoarece cei mai mulţi operoni ai acestuia sînt relativ scurţi.

Iniţial s-a considerat că deosebirea dintre genele timpurii şi cele tardive s-ar datora unei proteine specifice virale cu rol de represor, capabilă să blocheze în mod specific promotorii genelor tardive. Cercetările experimentale, pe de o parte, au infirmat această ipoteză şi, pe de alta, au demonstrat că reglarea multiplicării fagului are loc la nivelul transcrierii informaţiei genetice (ADN → ARNm) sub forma unui control pozitiv al expresiei genelor virale, exercitat de o serie de factori specifici virali care schimbă setul de gene promotor (timpurii → de mijloc → tardivi) „citiţi" de ARN-polimerază pe măsură ce infecţia fagică înaintează.

Imediat după infecţie, ARNm timpuriu este transcris de ARN-polimeraza bacteriană, alcătuită din 4 subunităţi (α, α', β şi β'), care formează „enzima minimală" („core"), asociate cu un factor σ care controlează specificitatea şi care este capabil să recunoască ~ 25 de promotori diferiţi ai ADN T4. Moleculele de ARNm transcrise prin acest mecanism sînt copiate după catena „l" a ADN în sens antiorar în raport cu harta genetică a fagului T4.

În cei mai mulţi dintre operonii timpurii sînt exprimate rapid numai genele situate în vecinătatea promotorului („imediat timpurii"), în timp ce genele situate mai distal („timpurii întîrziate") mai slab. Aceasta se datorează, pe de o parte, faptului că ARN-polimeraza are nevoie de mai mult timp pînă să ajungă la nivelul lor şi, pe de altă parte, stopării creşterii multor catene de ARNm precoce, înainte ca genele distale să fi fost transcrise. Este probabil că acest proces ar fi produs de factorul de terminare ρ al celulei-gazdă care ar bloca transcrierea cînd recunoaşte semnalele de stop ale genelor imediat timpurii (Watson, 1977).

Procesul de inițiere a transcrierii ARNm la nivelul genelor promotor timpurii începe să se oprească la ~ 5 minute (37°C) după infecție, deoarece produsul unei gene timpurii blochează factorul σ bacterian, împiedicînd formarea de ARN-polimerază activă.

Eliberate de factorul σ „enzimele minimale" devenite libere sînt activate din nou prin legarea unor factori de specificitate noi — molecule relativ mici de proteină codificate de virus — pentru a transcrie inițial promotorii de mijloc, apoi pe cei tardivi.

Promotorii de mijloc (numiți inițial *cvasitardivi*) intră în acțiune înainte de debutul replicării genomului și continuă să funcționeze pe toată durata ciclului de multiplicare virală. Unii dintre ei controlează transcrierea unor gene care au fost controlate anterior și de promotorii timpurii, reflectînd necesitatea ca aceste gene timpurii să funcționeze și după blocarea activității factorului σ și a ARN-polimerazei tipic bacteriană. Alți promotori mijlocii dirijează sinteza unor proteine sintetizate de-a lungul perioadei mijlocii pînă în faza tardivă. Natura factorilor de specificitate ai perioadei mijlocii nu este cunoscută (Watson, 1977).

Inițierea *promotorilor tardivi* (care controlează genele pentru proteinele structurale și factorii morfogenetici) este dependentă de produșii activității a două gene timpurii — genele 33 și 35, polipeptide de „specificitate" cu g.m. de ~ 12 000 dal, respectiv ~ 22 000 dal. Ei se leagă, de asemenea, de „enzima minimală" a ARN-polimerazei bacteriene determinînd legarea acesteia de promotorii tardivi și transcrierea în exclusivitate a catenei „r" a ADN fagic.

Acești factori adiționali determină utilizarea eficientă a informației genetice virale. În primul rînd, după infecția cu fagul T4, ribosomii *E. coli* sînt modificați în așa fel încît lucrează mai eficient cu ARNm T4 decît cu cei aparținînd gazdei. În plus, genomul viral codifică apariția a 8 specii diferite de ARNt care favorizează citirea de codoni mai obișnuiți în structura ADN viral decît în ADN bacterian, asigurînd o rată de sinteză mărită a proteinelor virale.

Mutantele fagice care nu produc aceste tipuri ARNt se multiplică, dar numărul de virioni produși este foarte mic în raport cu tipul sălbatic.

Asamblarea și morfogeneza fagului. Bacteriofagii a căror capsidă proteică este un edificiu arhitectural relativ complex nu se pot autoasambla. Moleculele proteice care îl compun nu se leagă între ele progresiv, pornind de la un centru formator (spre ex. de la o extremitate), și nici întîmplător. Constituenții principali (capul, genomul, coada, fibrele cozii) se formează de-a lungul unor căi separate, care evoluează după o ordine de reacție strict reglată, după care căile respective converg, iar structurile rezultate la capătul lor se leagă la rîndul lor între ele, de asemenea în mod coordonat. Un mecanism încă necunoscut împiedică apariția unei anumite trepte în formarea lor, înainte ca treapta specifică anterioară să se fi terminat. Cel puțin 50 de gene din cele aproximativ 200 ale fagului T4 sînt implicate în morfogeneza sa fie sub forma a diferite proteine structurale, fie ca proteine necesare în cantități mai mici pentru asamblare.

Lucrînd cu mutante ale fagului T4, obținute în laborator, Wood și Edgar (1966) au demonstrat că virusul este sintetizat și construit „pe

bucăţi", fiecare adiţie de constituenţi noi fiind controlată de gene diferite. Dovada constă în faptul că, la fagii respectivi, fiecare genă mutantă formează în locul unei proteine normale o proteină alterată, nefuncţională şi, ca urmare, dezvoltarea virusului stopează în punctul unde este necesară proteina respectivă. Prin acest mecanism — utilizîndu-se diferite mutante — se poate stabili poziţia genelor pe harta cromosomului respectiv şi se poate demonstra acţiunea lor în dezvoltarea virusului. Observîndu-se la microscopul electronic ce structuri ale fagului lipsesc, ca rezultat al mutaţiei unei anumite gene, se poate deduce funcţia morfogenetică normală a genei respective. Acest lucru este posibil întrucît blocarea formării uneia dintre structuri nu afectează asamblarea celorlalţi constituenţi care se acumulează în celulă sub forma lor normală şi completă. Pentru a descifra modul în care se face sinteza diferiţilor constituenţi, rolul fiecărei gene, modul de asamblare a diferitelor structuri libere într-un virus infecţios şi succesiunea diferitelor trepte în asamblarea acestuia, Wood şi Edgar au folosit diferite extracte ale unor celule bacteriene în care s-au multiplicat fagi defectivi. Defectul genetic consta, spre exemplu, în aceea că în loc de virus complet se formau numai una, două sau trei structuri din componenţa sa: de exemplu, numai capul fagic (nu şi cozile şi fibrele) sau numai fibrele (fără cozi şi capete) etc. Amestecînd extracte de acest fel în diferite combinaţii, ei au reuşit să reconstituie fagul T4 activ pornind de la constituenţii săi. Spre exemplu, amestecînd două extracte, unul conţinînd cozi şi fibre libere (fără capete) şi un altul numai capete şi fibre libere (fără cozi) au obţinut virus infecţios ca rezultat a două reacţii succesive: una de fixare a cozilor la capete şi alta de fixare a fibrelor la particulele cu coadă rezultate.

În concluzie, cercetările lui Wood şi Edgar (fig. 102) arată că fagul nu este construit printr-un proces care începe de la un capăt şi continuă, prin adăugarea secvenţială de subunităţi, pînă ce ajunge la capătul celălalt (aşa cum se croşetează un ciorap), ci este constituit din porţiuni separate, pe trei linii principale de „asamblare", care duc independent la formarea capului, a cozii şi a fibrelor cozii. În treptele următoare, compuşii finiţi care au rezultat se combină pentru a forma particula virală. Un mecanism complicat asigură formarea capului fagic, printr-o serie de faze intermediare, corespunzînd structurilor „precursor" al capului, vizibile la microscopul electronic, numite „precap" de tipul I, II şi III.

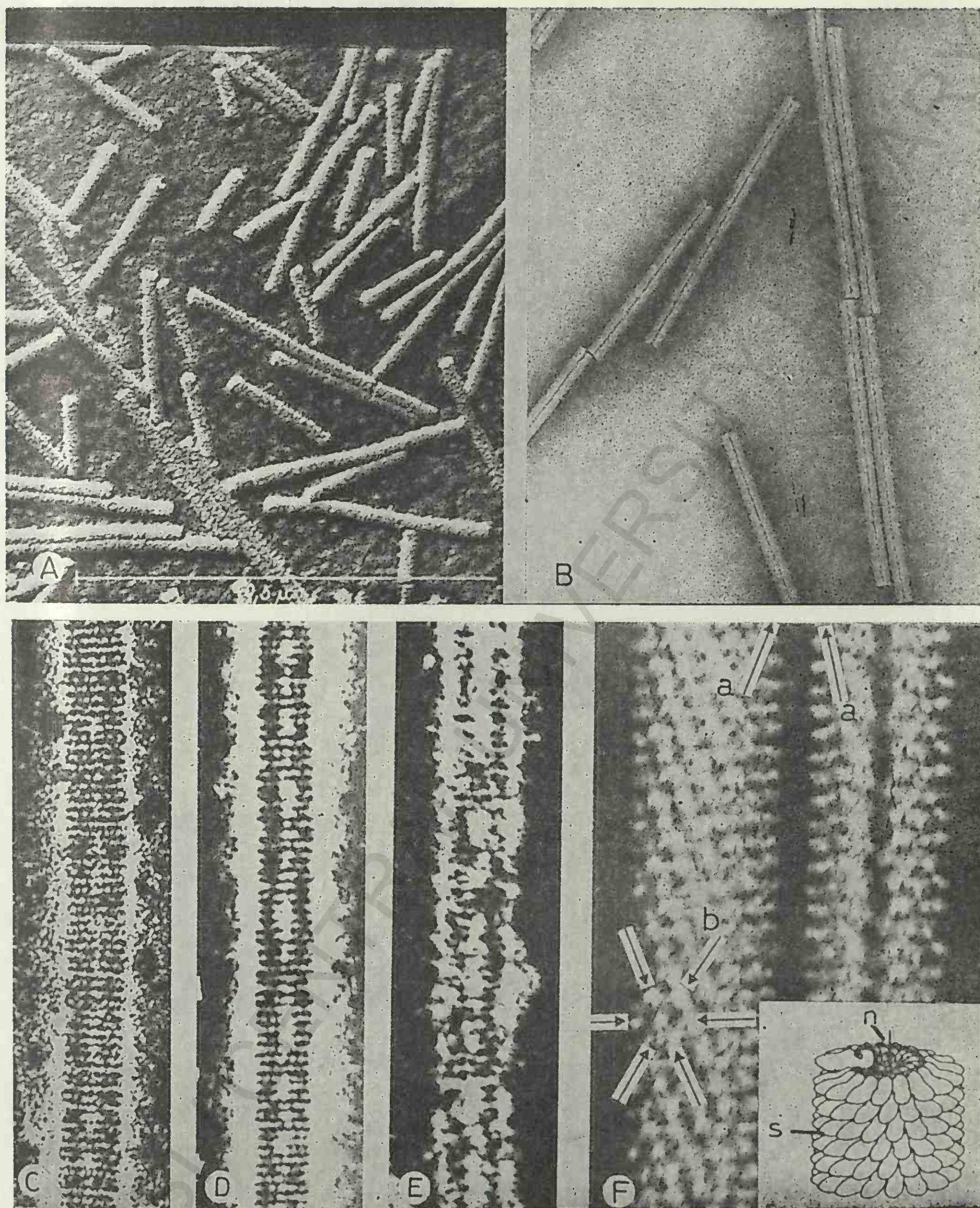
Formarea capului este realizată, cel puţin la unii fagi, cu ajutorul a 200—300 molecule de *proteine speciale de asamblare* care catalizează reacţia de polimerizare a proteinelor structurale într-un *precap de tip I*, prima structură proteică cu forma de icozaedru sau icozaedru alungit, asamblat pe o structură centrală proteică. Precapul de tip I, la a cărui formare participă produşii a cel puţin 10 gene diferite, nu conţine ADN, este foarte fragil în lizatele celulare şi este convertit în *precap de tip II*. La sfîrşitul procesului de replicare, ADN T4 nou sintetizat se acumulează în celula bacteriană sub formă de molecule lungi poligenomice *(ADN concatemer)*. Maturarea lor în molecule genomice implică secţionarea, cuplată cu încapsidarea în capetele fagice nou sintetizate. Procesul începe în cursul conversiei precapului tip II în *precap III* şi se încheie prin transformarea acestuia în *cap matur* (Wagner, 1976). Unele proteine asi-

gură „aspirarea" ADN în precap și probabil altele ghidează rularea și supercompactarea lui, necesară pentru a închide 60 μm ADN într-o capsidă cu ∅ de 95 nm.

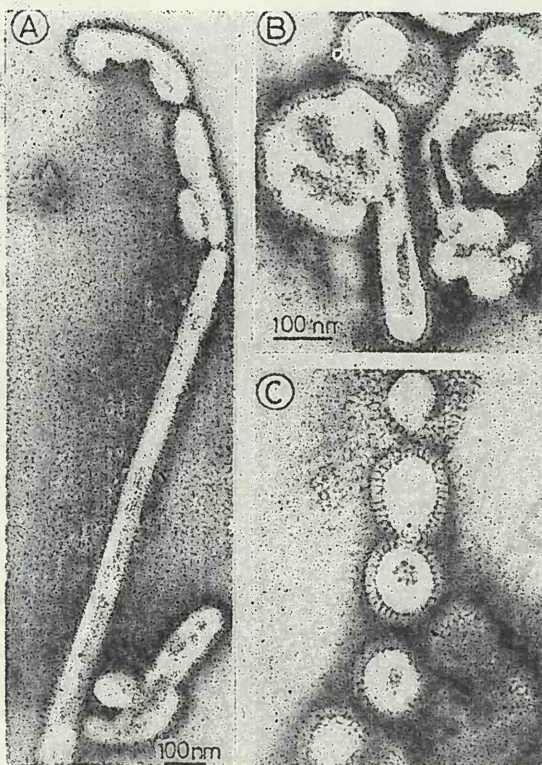
ADN se rulează ca o bobină al cărui ax este perpendicular față de cel al cozii. „Bobinarea" începe în cap, cu spiralele cele mai exterioare, ultima porțiune de ADN care intră în cap (situată în centru) fiind prima care iese în cursul infecției viitoare. În cursul acestei faze, proteina de

Fig. 102. — Căile de asamblare ale fagului T4, cu indicarea genelor morfogenetice. Săgețile arată principalele trepte ale procesului de asamblare (după Showe și Kellen, 1975).

asamblare a capului este înlocuită de ADN, determinînd modificări de sarcină electrică ce favorizează plierea ADN. După ce capul a fost „umplut" cu cantitatea de ADN corespunzătoare unui genom fagic, acesta este „tăiat" de restul intermediarului de replicare pentru a produce o moleculă de ADN matur, corespunzînd formei în care se găsește în virion. Secționarea ADN se face în așa fel încît fiecare cap fagic înglobează ~102 % din lungimea genomului.

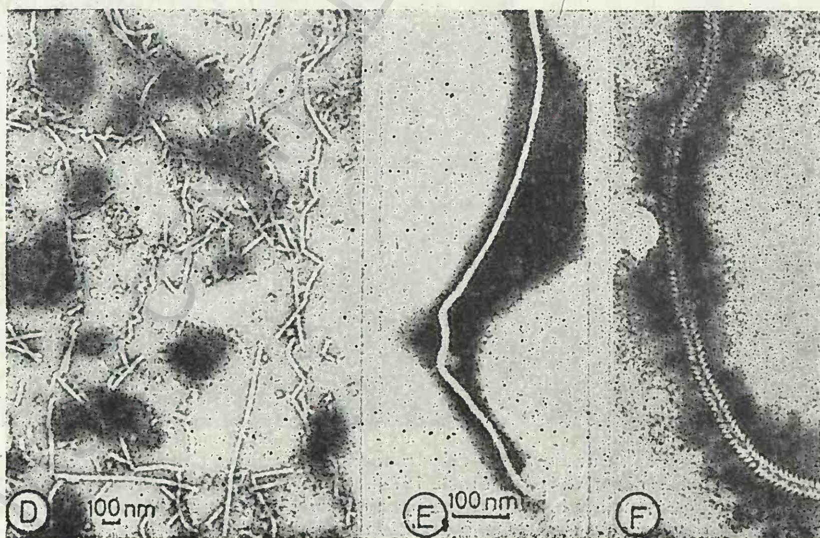


Pl. 1 — Virusul mozaicului tutunului. Microelectronografii. A. După umbrire cu WO_3 (Max Planck Institut). B. După colorație negativă (după Finch, 1978). C. D. E. Agregate de proteină deVMT, formate din discuri suprapuse, ca monedele într-un fișic: imagini prelucrate după microelectronografii în cîmp întunecat, scanning și microscop electronic convențional (contrast invers) (după Engel, Kellenberger și colab., din Holt, 1982). F. Imagini prelucrate a doi virioni dispuși paralel pentru intensificarea particularităților de structură regulată, evidențiate în schemă: pasul helical (a) de 2,3 nm, unități de structură (s) centrale înconjurate de 6 unități învecinate (săgețile b), modelul de structură helicală primară și secundară; n — ARN inclavat în capsida proteică. Virionul din dreapta prezintă canalul axial central în care a pătruns colorantul electronoopac (după Horne și colab., 1976).

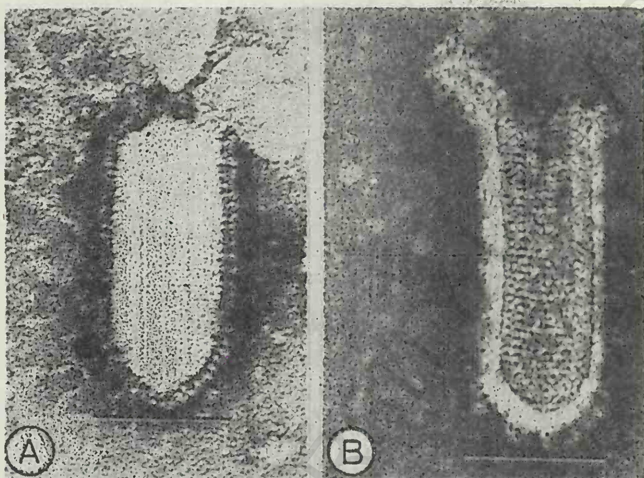


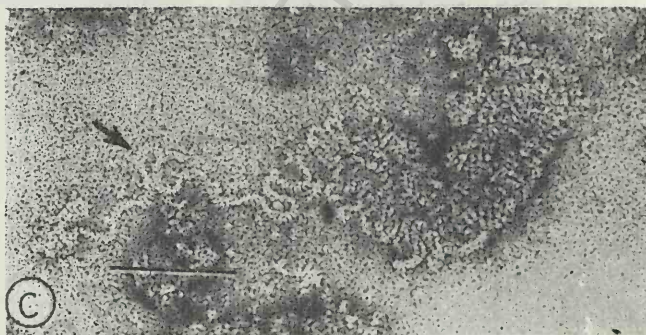
Pl. 2 — *Orthomyxovirus* — — electronomicrografie. **A.** Forme filamentoase caracteristice virusului recent izolat. **B.** Particule sferice pleomorfe. **C.** Particule sferice la care sînt evidente prelungirile lineare (spicule) de pe suprafaţa învelişului viral (după Laver şi Horne, 1973).

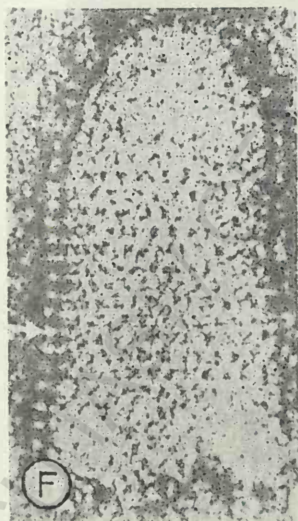
Virusul rujcolei. **D.** Ultrastructura nucleocapsidei. **E.** Fragment mărit lung de 1,15 µm (207 tururi de helice). **F.** Segment de nucleocapsidă după coloraţie negativă (după Norrby şi Hammarskjold, 1972).

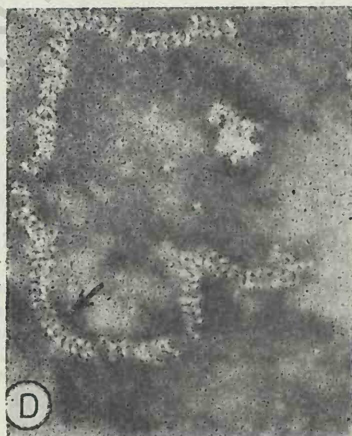


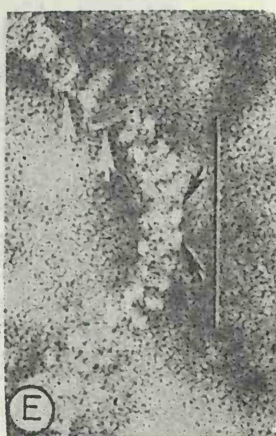
Pl. 3 — *Rhabdovirus*. Microelectronografie prezentînd un virion de VSV colorat negativ, cu peplomere la periferie (A) şi cu striaţii transversale evidente după pătrunderea colorantului (B). C. D. E. Porţiune din nucleocapsida cu Ø de 5 nm, derulată, examinată după o mărire progresivă pentru a evidenţia structura formată din subunităţi repetate (după Simpson şi Hauser, 1966). Bara = 100 nm. F. Virion de virus rabic după tratare cu fosfotungstat. În partea stîngă se observă spiculele cu structură în buton, la extremitatea lor distală marcate cu săgeată (după Hummeler şi Koprowski, 1967).

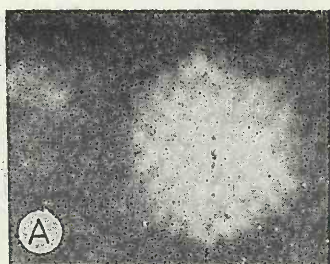


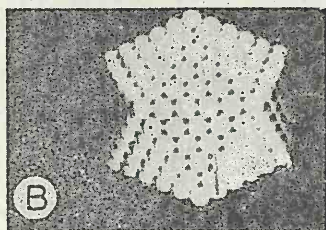


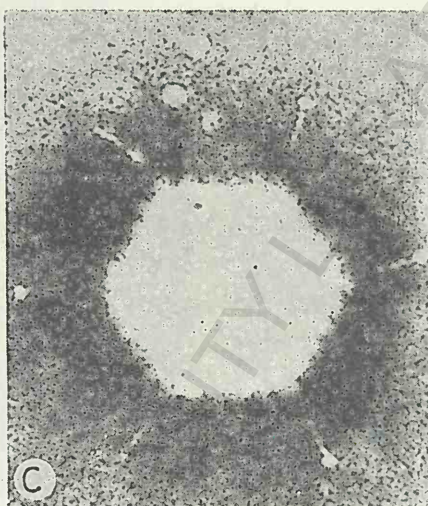






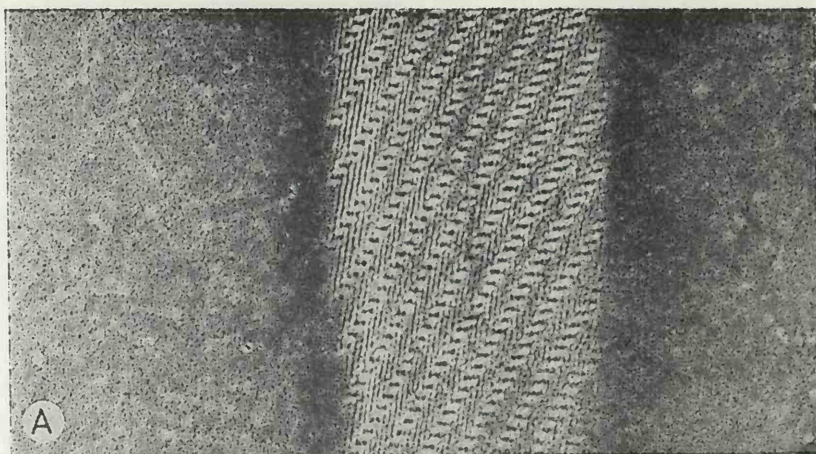


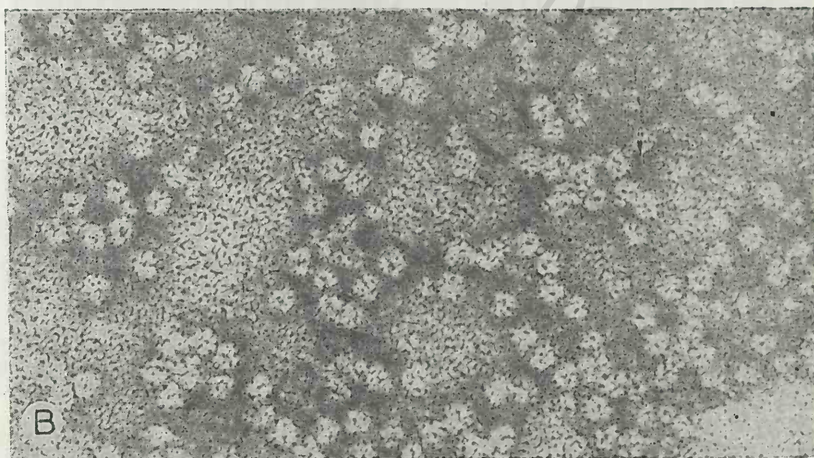


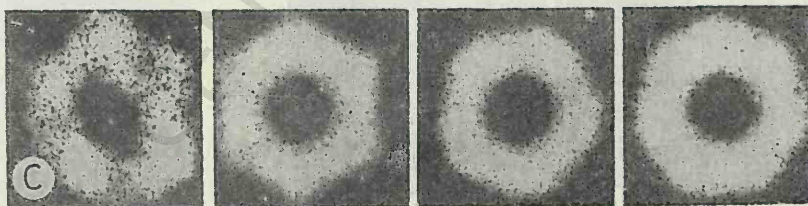




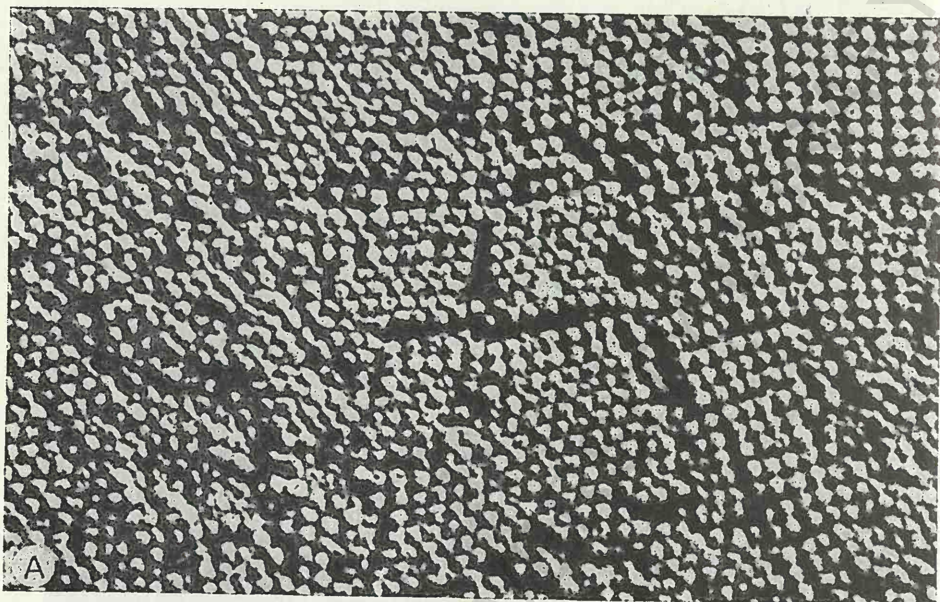
Pl. 4 — *Adenovirus.* **A.** Microelectronografie evidenţiind aranjarea simetrică a capsomerelor. **B.** Model de structură icozaedric constituit din 252 mingi de tenis de masă, fotografiat în aceeaşi orientare ca şi particula virală din (A). **C.** Virion prezentînd fibrele pentonilor la vertexurile icozaedrului (după Horne şi Valentine, 1964). **D.** Pentoni şi fibre de *Adenovirus* tip 5 (după Wrigley, 1979).

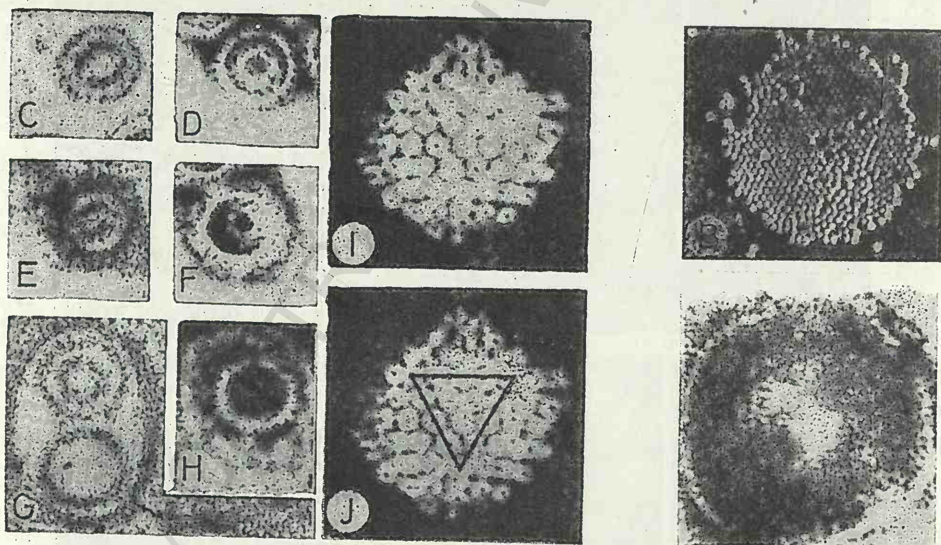




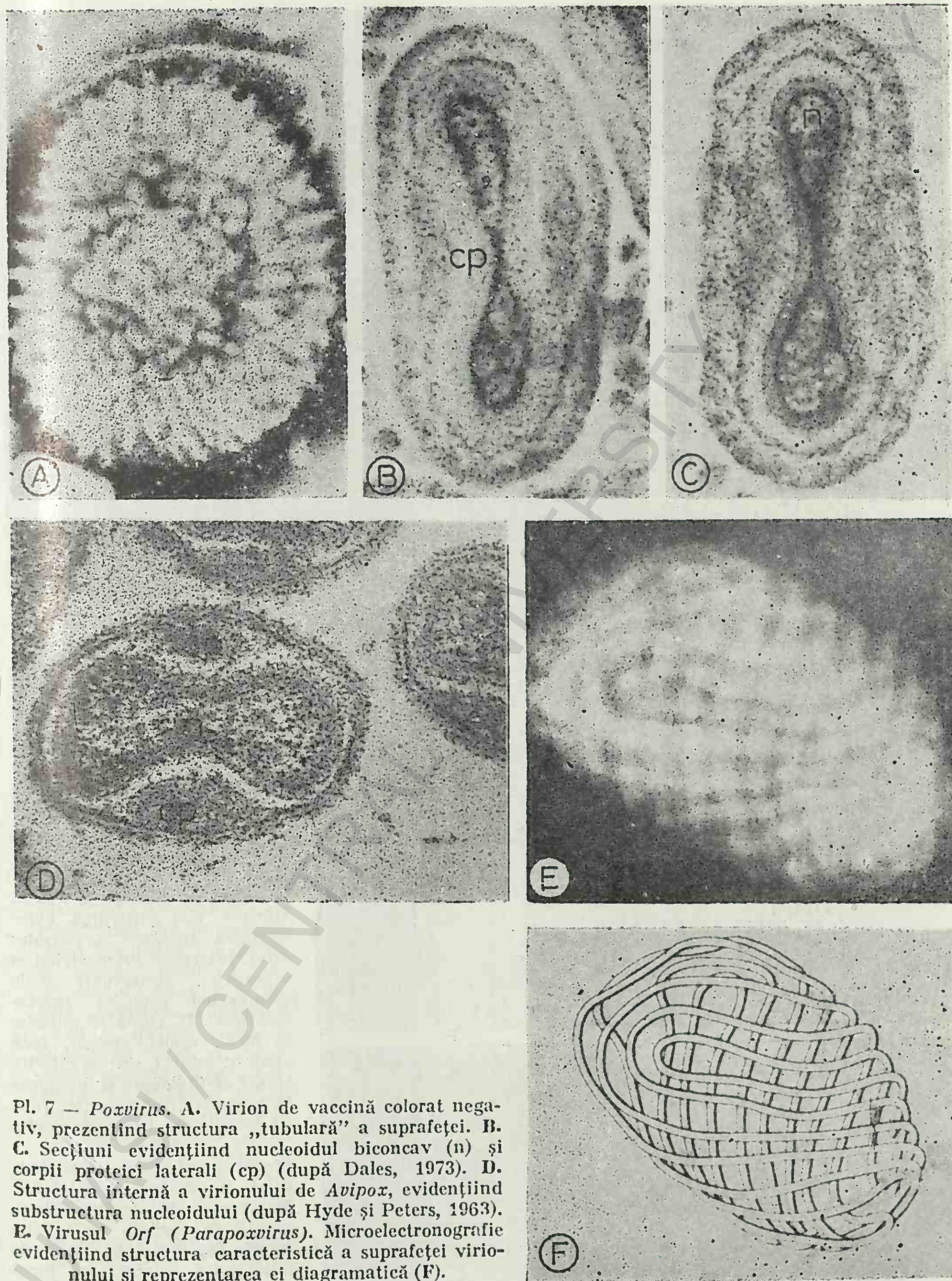


Pl. 5. — *Adenovirus* tip 5. **A.** Cristal de proteină tip 5 și fibrele asociate (după Wrigley, 1979). **B.** Microelectronografia antigenelor purificate de hexoni, evidențiind forma poligonală a capsomerelor cu un canal central (după Wilcox, Ginsberg și Anderson, 1963). **C.** *Adenovirus* tip 2. Structura hexonilor evidențiată cu tehnici speciale (după Hoagland, 1978).

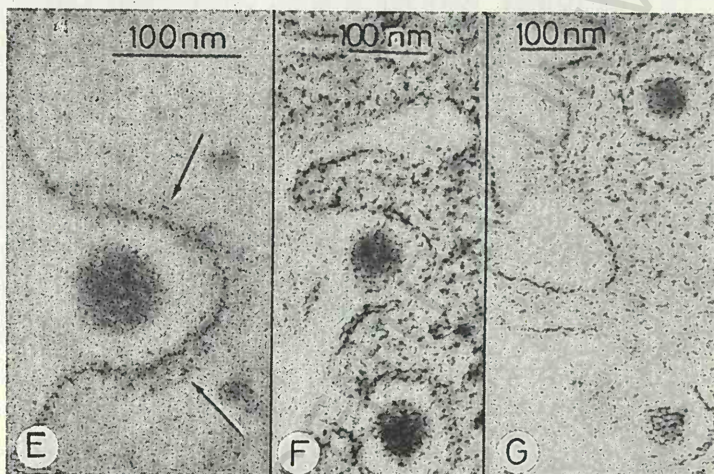


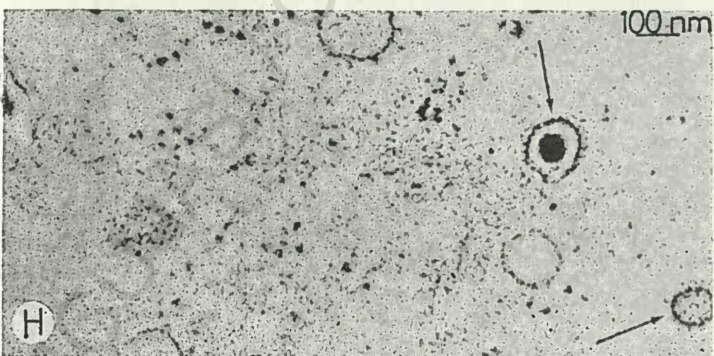


Pl. 6 — *Poliovirus* — particule virale purificate (A. B). *Herpesvirus*. **C. D.** Particule alcătuite din porţiunea centrală şi trei capside concentrice. **E. F.** Aceleaşi particule acoperite de un material amorf (membrana internă). **G. H.** Nucleocapside cu înveliş extern. **I. J.** Capside nude de Herpes simplex virus, evidenţiind o faţă triunghiulară a icozaedrului. **K.** Particulă virală prezentînd detalii de structură a învelişului extern, datorită pătrunderii colorantului (microelectronografii după Roizman şi Spear, 1976).



Pl. 7 — *Poxvirus*. A. Virion de vaccină colorat negativ, prezentînd structura „tubulară" a suprafeţei. B. C. Secţiuni evidenţiind nucleoidul biconcav (n) şi corpii proteici laterali (cp) (după Dales, 1973). D. Structura internă a virionului de *Avipox*, evidenţiind substructura nucleoidului (după Hyde şi Peters, 1963). E. Virusul *Orf* *(Parapoxvirus)*. Microelectronografie evidenţiind structura caracteristică a suprafeţei virionului şi reprezentarea ei diagramatică (F).

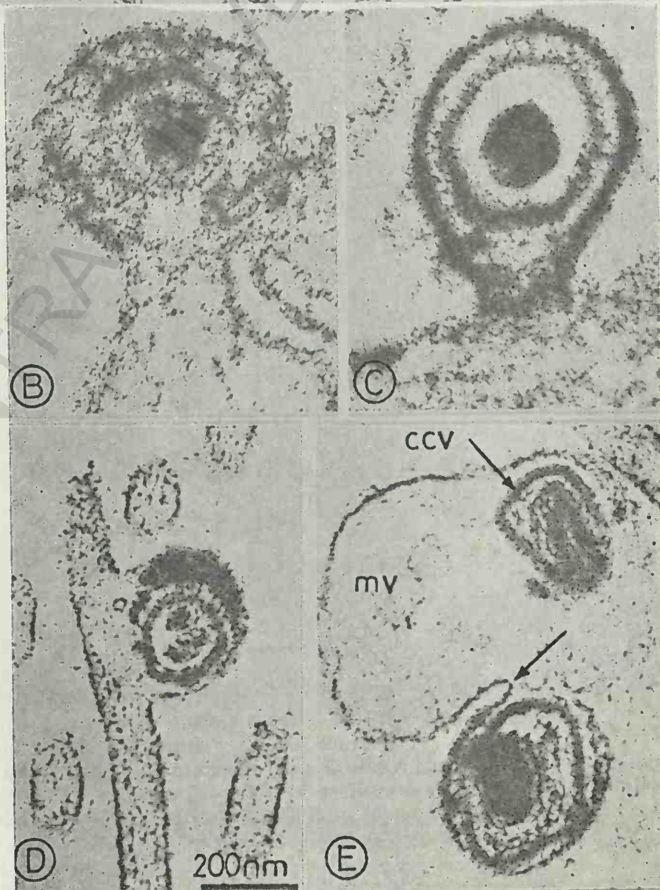




Pl. 8 — Pătrunderea virionilor de *Myxovirus* în celulele tumorii de ascită Ehrlich (A) — — adsorbţia particulelor. B. C. Mărirea mai puternică evidenţiază spiculele învelişului viral, interpuse între virion şi segmente invaginate ale membranei celulare (prefagocitoză). D. După 10 minute, la 36°C, mulţi virioni, încă aparent intacţi, sînt în diferite stadii de înglobare şi includere în vacuole citoplasmatice (după Bachi, din Hŏwe şi colab., 1980).

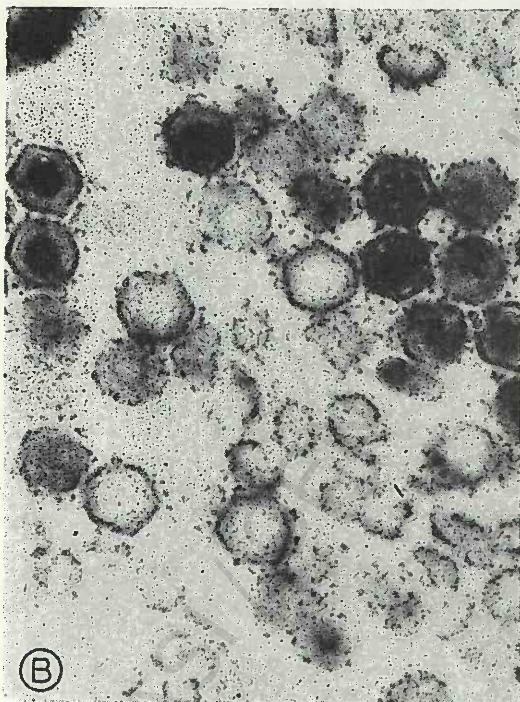
Stadii în viropexia adenovirusului tip 5 în celule HeLa. Membrana plasmatică invaginată (E) capătă un înveliş intern mai gros (F), care rămîne încă evident în jurul vacuolelor citoplasmatice, fiecare conţinînd o particulă virală (G, H) (după Chardonnet şi Dales, 1970).

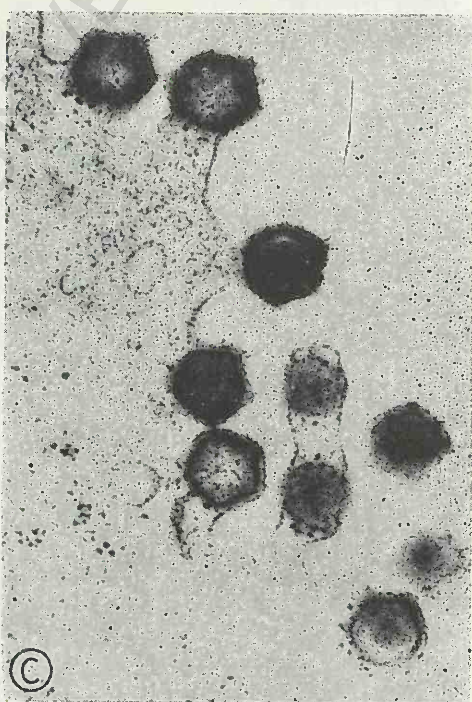




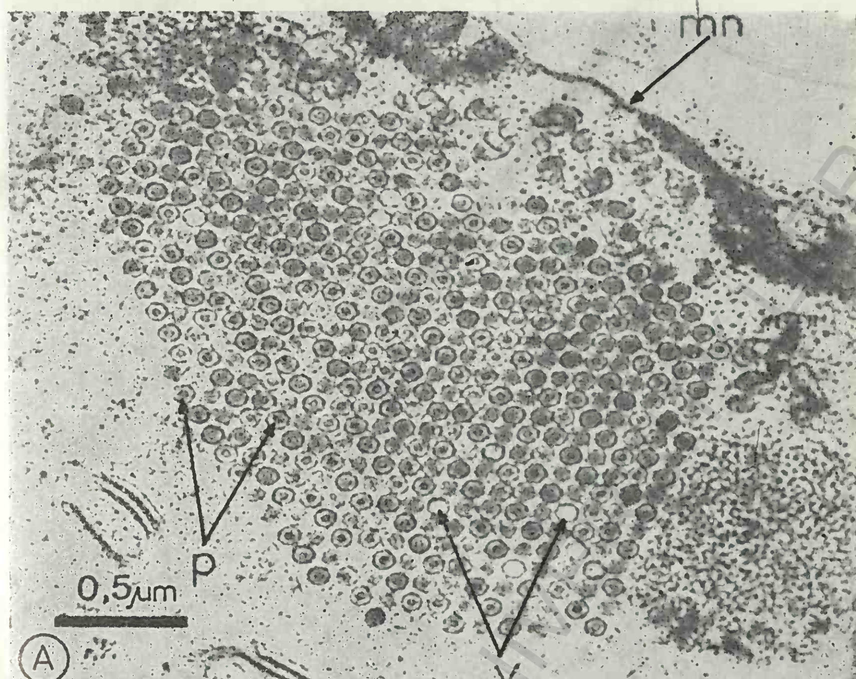
Pl. 9 — **A.** Infectarea celulelor de rinichi de maimuţă cu virusul Simian 5. După 20 de minute de la inoculare, la 37° C, particulele virale cu învelişul extern intact sînt observate în invaginaţii profunde ale membranei sau în vacuole după Compans, din Höwe şi colab., 1980). **B. C.** *Herpesvirus* adsorbit pe celule HeLa, evidenţiind două stadii din fuziunea învelişului viral în membrana celulară (după Miyamoto şi Morgan, 1971). Pătrunderea virusului *Pox (Amsacta moorei)* în celulele epiteliului intestinal al larvei de *Estigmene acraea* după inoculare *per os* cu $5 \cdot 10^7$ corpi de incluziune. **D.** Virusul fixat pe vîrful unei vilozităţi. **E.** Corpul central viral (ccv) pătruns după fuziunea membranei celulare cu învelişul viral (→). mv — microvil (după Granados, 1973).

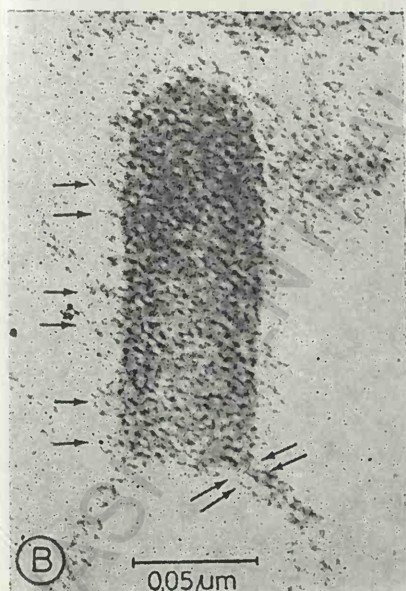


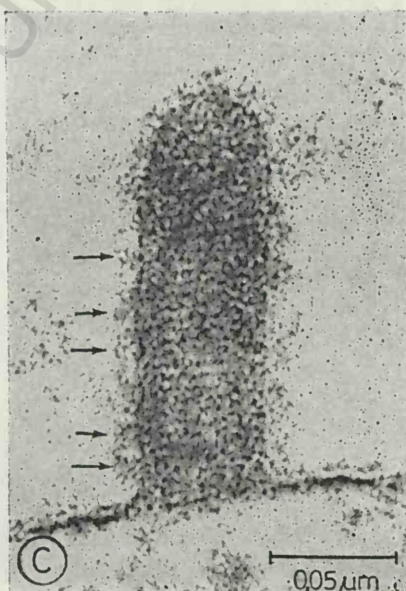




Pl. — 10 Nucleoproteină de *Adenovirus* tip 5 trecind în nucleu, în timp ce resturile capsidei rămin în citoplasmă (A) (după Morgan, 1969).
Secţiune fină printr-o celulă renală de porc infectată cu virusul febrei porcine africane, evidenţiind virioni maturi şi în curs de dezvoltare în „fabrici" de virus citoplasmatice (B). Virionii maturi sînt eliberaţiprin înmugurire din membrana plasmatică (C) (după Breese, 1966).







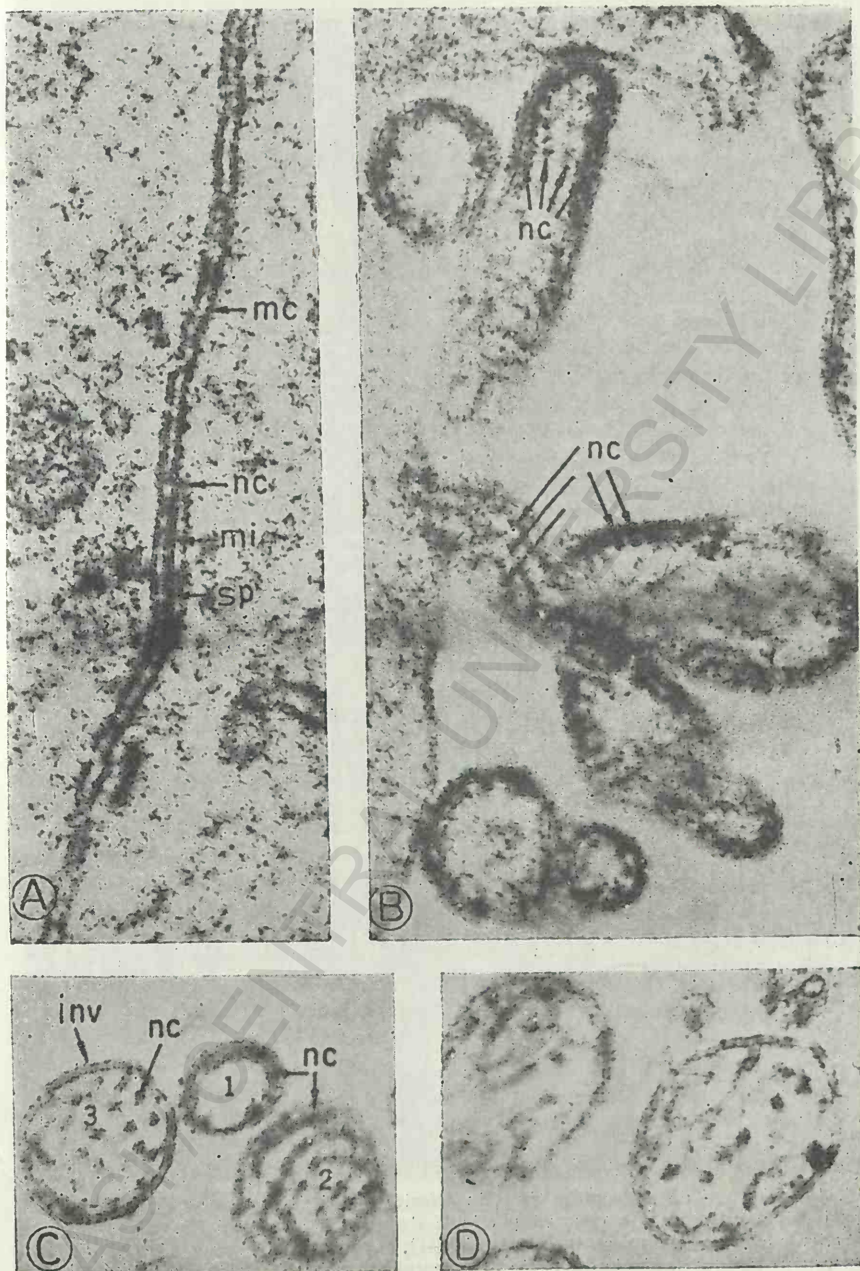
Pl. 11 — Aglomerat intranuclear de nucleocapside virale nude, cu aspect hexagonal (A): v — capside goale, p — capside care conţin acid nucleic, mn — membrana nucleară (după Moustardier, 1973).

B. C. Virusul stomatitei veziculare pe cale de eliberare de pe suprafaţa externă a celulelor L, după 5 ore de la inocularea culturii. Săgeţile duble indică regiunea de aparentă continuitate între membranele celulare şi virale, iar cele simple, spiculele de pe suprafaţa externă a virusului. În (C) este evidentă structura internă regulată a nucleocapsidei (din Dales, 1978).

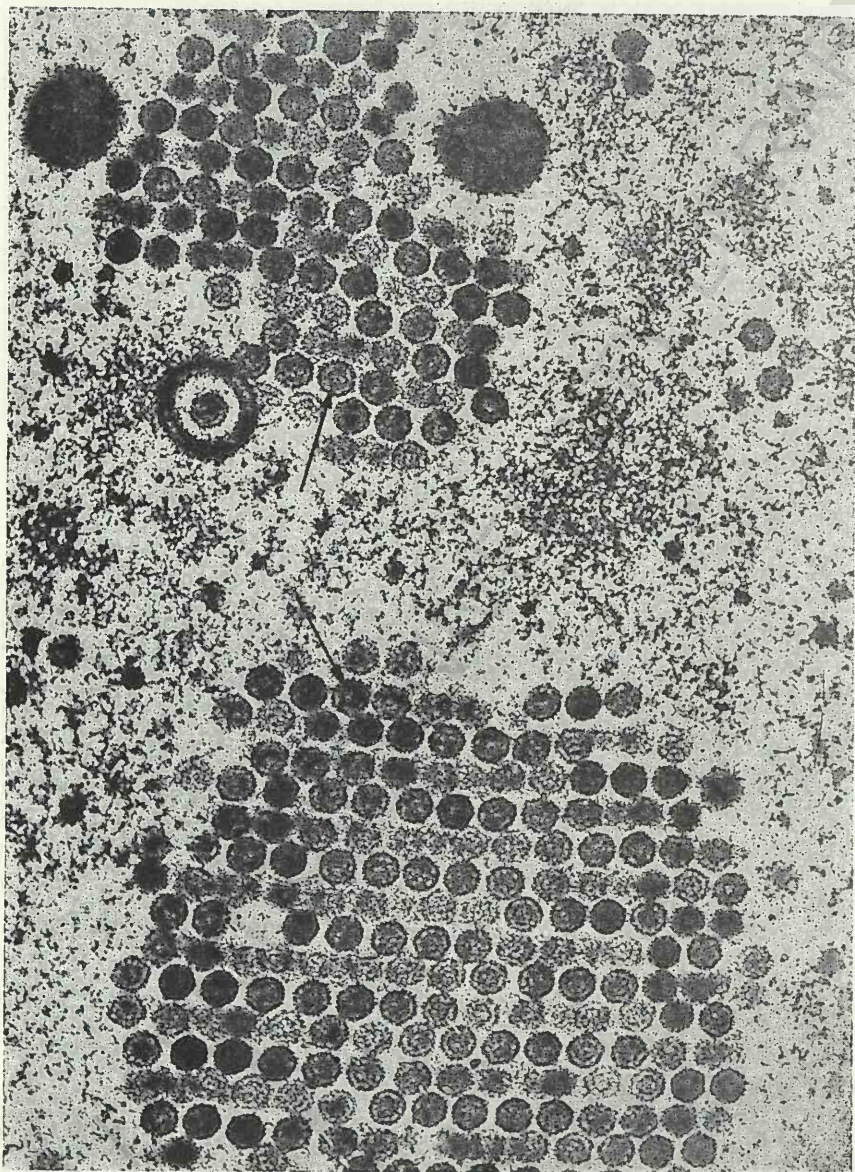


Pl. 12 — A. *Togaviridae*. Secţiune fină evidenţiind nucleocapsidele virale dintr-o celulă infectată şi formarea învelişului viral în cursul înmuguririi prin membranele vacuolelor citoplasmatice (după Tan, din Fenner, 1974).

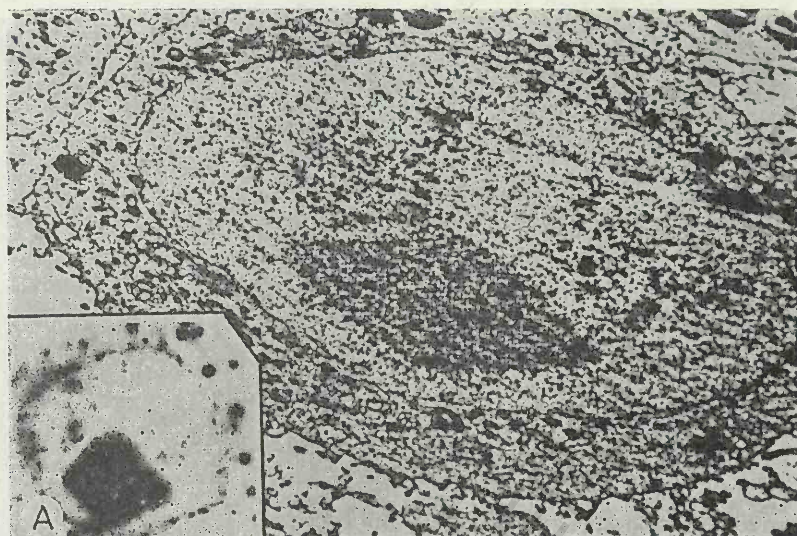
B. *Paramyxovirus*. Formarea învelişului extern al virionilor şi înmugurirea lor prin membrana celulelor de embrioni de găină. „Înmuguriri" virale în diferite stadii de dezvoltare (mv1, mv2, mv3). Se observă membrana celulară alterată, formînd învelişul viral (îv) şi nucleocapsida (nc) situată sub înveliş (după Berkaloff, 1963).

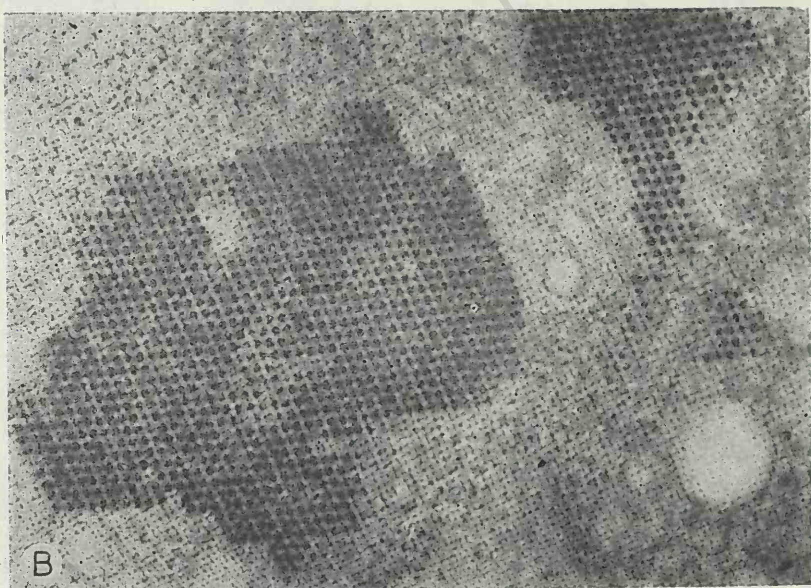


Pl. 13 — *Paramyxovirus*. A. Diferenţierea învelişului viral la nivelul membranei celulare : se observă membranele celulare (mc) a două celule adiacente. În contact cu nucleocapsidele (nc) membranele celulare se diferenţiază în membrana internă a învelişului (mi) şi stratul extern cu spicule scurte (sp). B. După aranjare, nucleocapsida presează asupra membranei, determinînd formarea „mugurilor". C. D. Secţiuni prin virioni evidenţiind structura învelişului (inv) şi aranjarea nucleocapsidei : 1 — nucleocapsida este aranjată paralel cu învelişul ; 2,3 — nucleocapside aranjate neregulat (după Berkaloff, 1963).



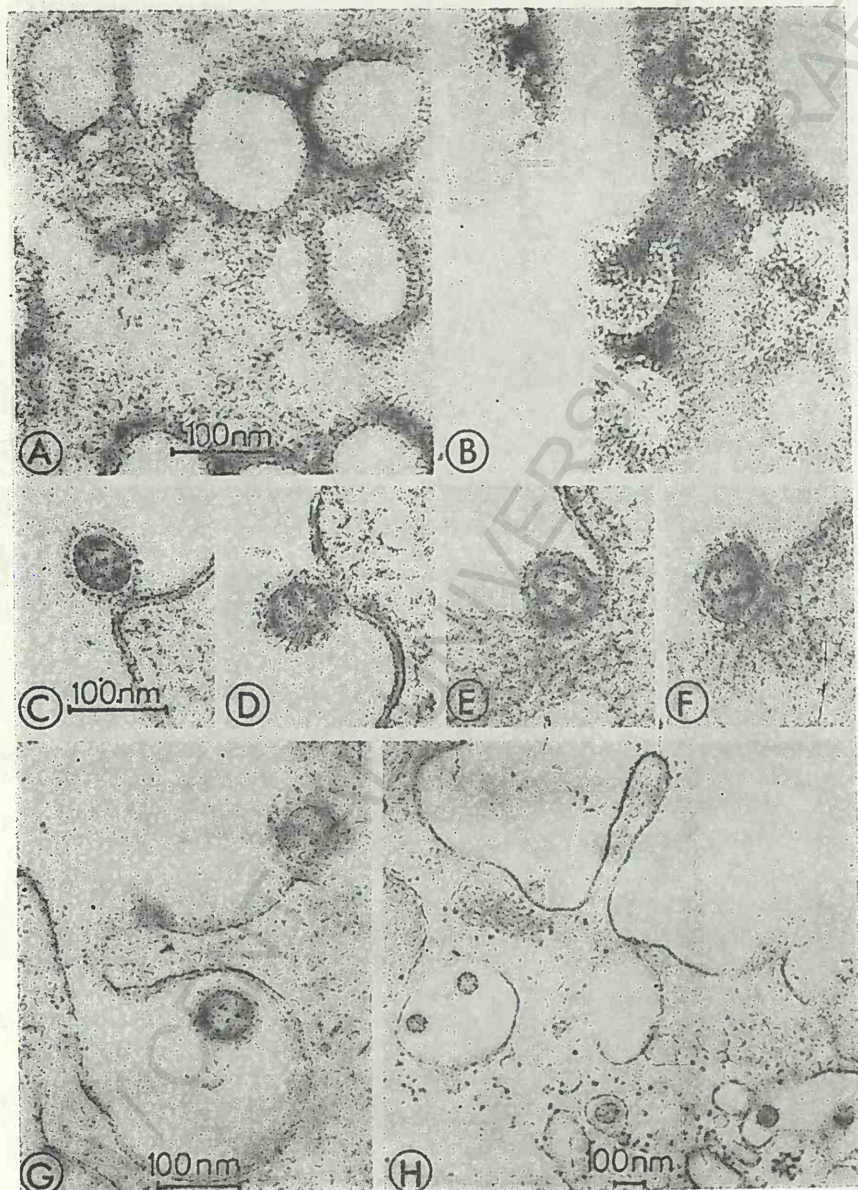
Pl. 14 — Virioni de *Adenovirus* tip 4 în diferite stadii de morfogeneză în interiorul unei celule infectate. Se observă particule dense fără structură internă evidentă, particule cu un corpuscul central, nucleoid (→), înveliş extern şi capsidă. Unii virioni au contur poligonal. Unele diferenţe în aspectul virionilor sînt determinate de conţinutul în ADN şi/sau de planul în care s-a făcut secţiunea (după Morgan şi Rose, din Davis, 1969).



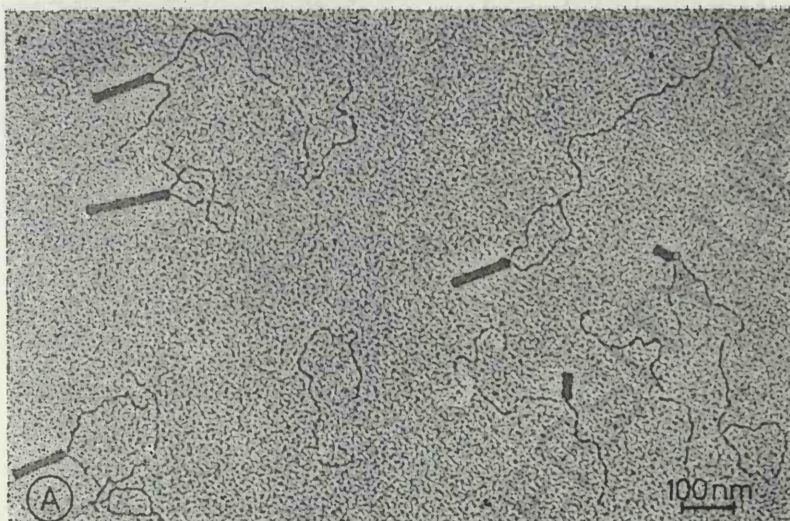


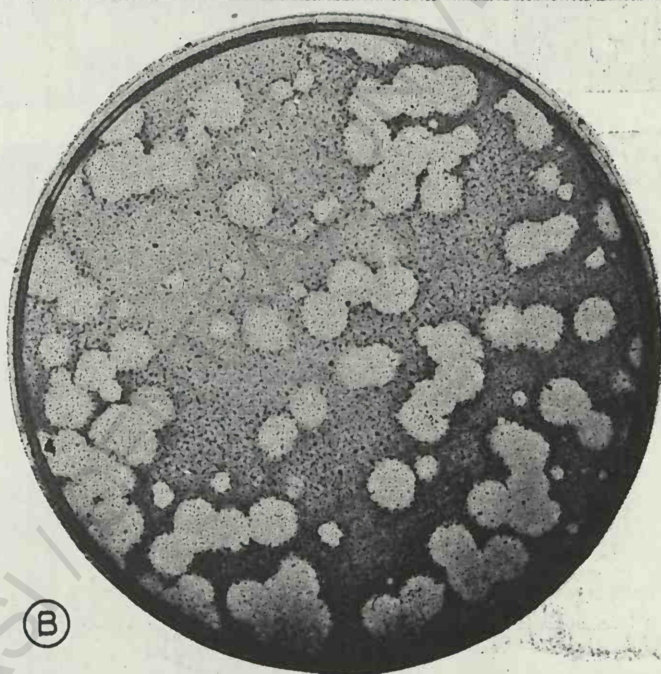
Pl. 15 — A. Agregat de particule de *Adenovirus* cu aspect de cristal regulat, cu profil romboidal în nucleul unei celule infectate (micrografie electronică pe secţiune ultrafină — după Bloch, 1962).

B. Agregat cristalin de *Poliovirus* în citoplasma celulelor HeLa infectate (după Dales, Eggers, Tamm şi Palade, 1965).



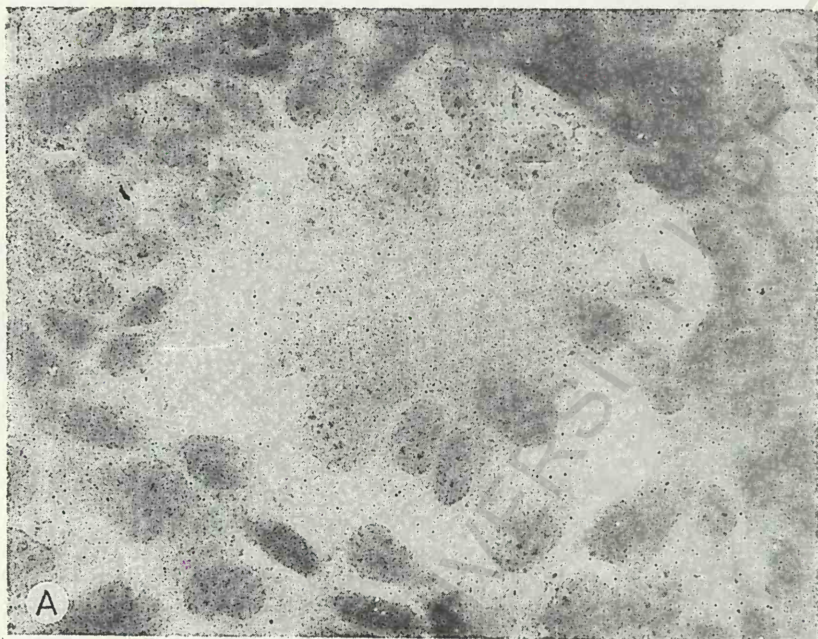
Pl. 16 — Pătrunderea virusului gripal în celulele membranei chorioalantoidiene. Microelectronografiile sugerează fie fuziunea învelişului viral cu membrana plasmatică (A—F), fie înglobarea virionilor intacţi, urmată de decapsidare (G—H) (după Morgan şi Dales, 1968).

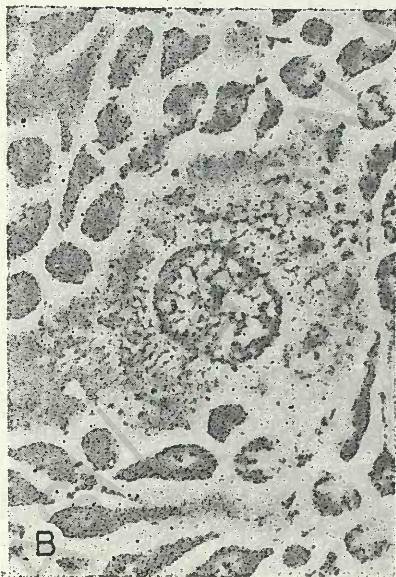




Pl. 17 — A. Microelectronografia VMT pe cale de creştere. Particulele virale au două „cozi" de ARN la capătul opus celui la care are loc alungirea particulei (după Lebeurier, 1977).

B. Formarea plajelor de liză celulară în culturi monostratificate după inocularea cu un *Myxovirus*. Plajele mari, rotunde, sînt produse de virusul sălbatic, iar cele mici, cu margini nete şi dinţate neregulat, sînt produse de o tulpină virală mutantă (din Davis, 1969).

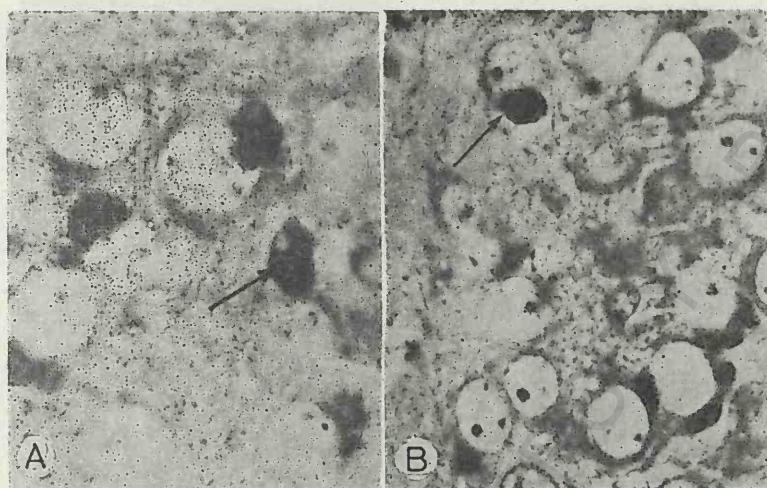




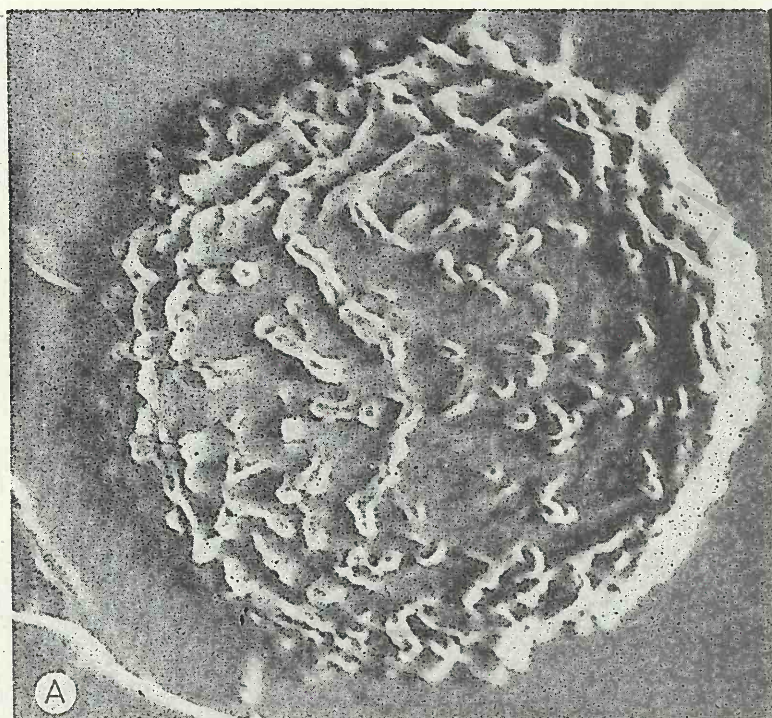


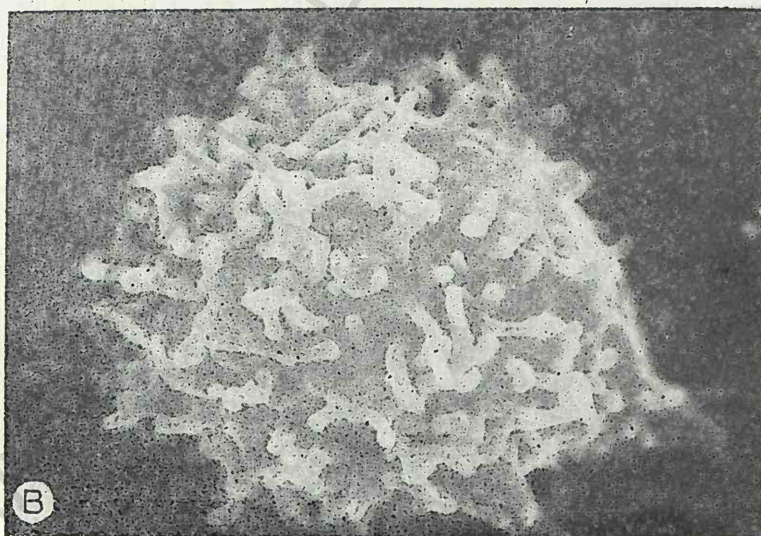
Pl. 18 — A. Formarea de sinciţii în celule de rinichi de maimuţă, indusă de virusul rujeolei.

B. C. Localizarea antigenelor unui *Myxovirus* aviar în nucleul celular după 3 ore de la infectarea unei culturi de celule L. Celulele au fost tratate cu anticorpi fluorescenţi faţă de antigenul viral. B — micrografie în contrast de fază; C — micrografia aceluiaşi cîmp în ultraviolet, evidenţiind numai zonele în care anticorpii au fost legaţi de antigenul viral (după Frankun şi Breitenfeld, 1957).

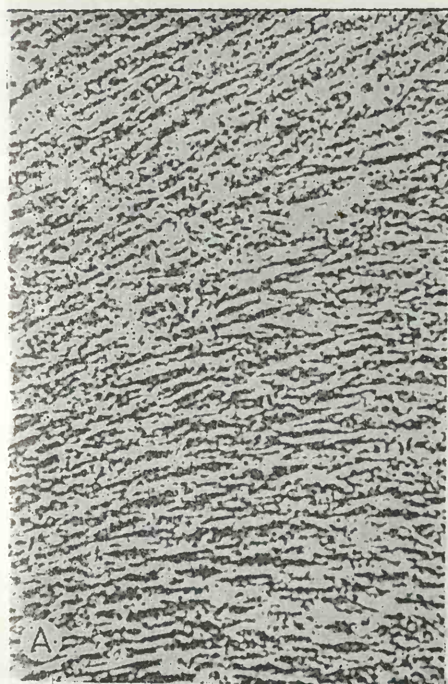


Pl. 19 — Incluziunile virale. Corpi Babeş-Negri în creierul de şoarece, infectat cu virus rabic. Săgeţile indică prezenţa incluziunilor evidenţiate prin colorare cu dinitrofluorbenzen (A) şi cu tehnica acroleină-Schiff (B) (după Koprowski, din Davis, 1969). C. Virusul hepatitei B (*Hepadnavirus* tip 1). Cele trei tipuri de particule observate în plasma sanguină a bolnavilor : 1 — particule de antigen HBS ; 2 — „tubuli" ; 3 — particule Dane opace sau transparente la electroni (microelectronografie, Institutul Pasteur, Paris, din Pillot, 1982).





Pl. 20 – Limfocit B normal (A) și leucemic (B). Microscopie electronică în scanning (după Manolescu, Institutul Pasteur, București, 1982).

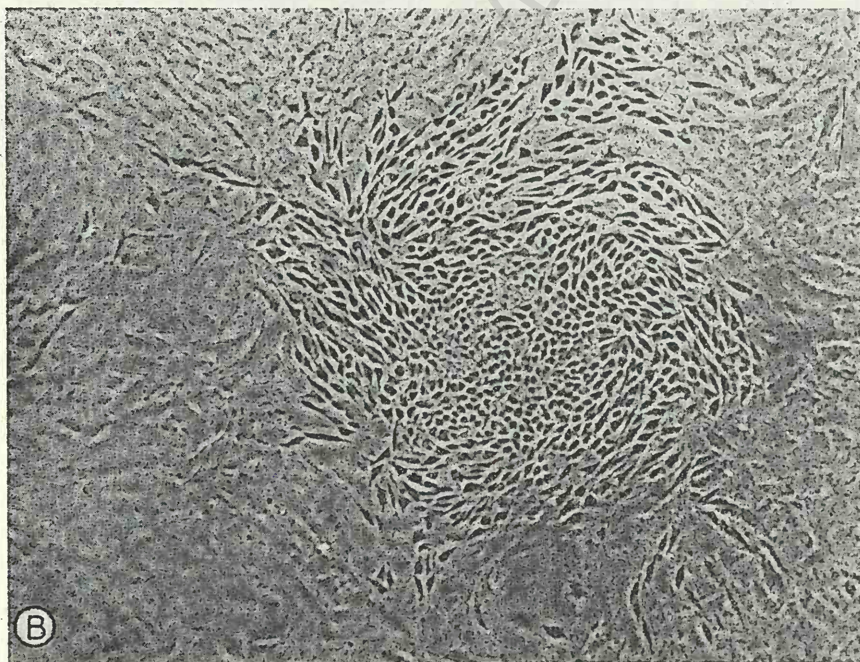




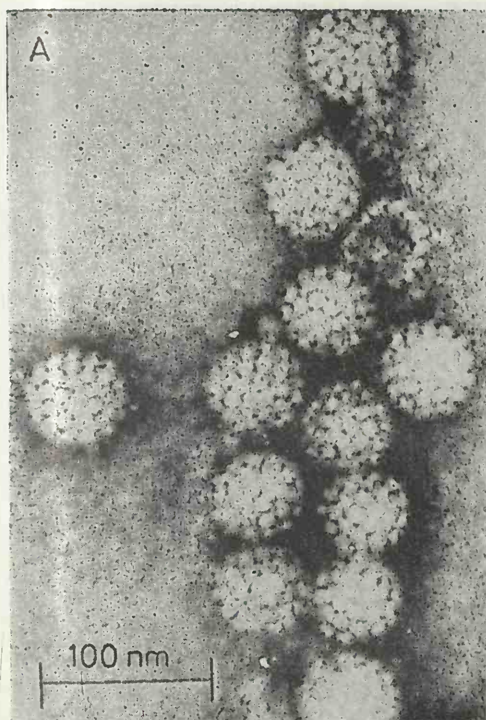


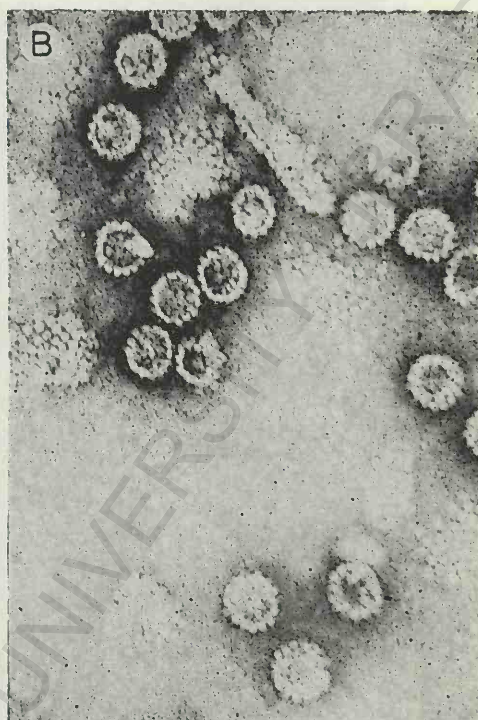
Pl. 21 – Caracteristicile de multiplicare pe o suprafață solidă ale unor culturi de celule normale (A), comparativ cu cele transformate malign (B). C. Celule sferice tumorale de șoarece (ascită Ehrlich), alternînd cu celule normale plate (microscopie în contrast de fază) (după Prunieras, 1973).

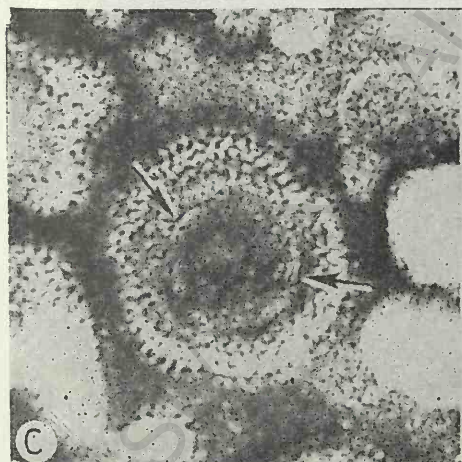


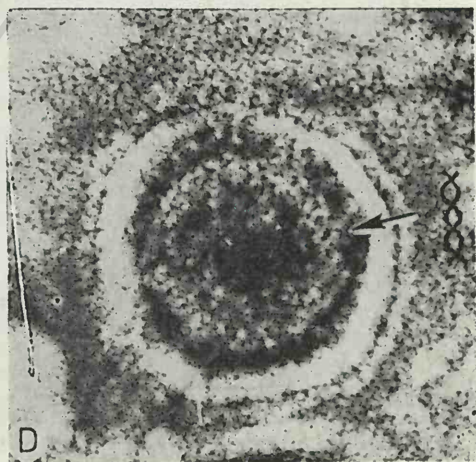


Pl. 22 — **A.** Colonie de celule de rinichi de hamster (linia BHK) infectată cu virusul poliomului. Colonia transformată, marcată cu săgeți, poate fi recunoscută prin grosimea ei foarte mare și prin orientarea la întîmplare a celulelor componente. Coloniile netransformate sînt fine și conțin celule care au tendința de a se orienta paralel unele față de altele (după Stoker, din Davis și Dulbecco, 1969). **B.** Focar de celule de șobolan transformate malign (virusul sarcomului Kirsten) (după Aaronson, 1970).



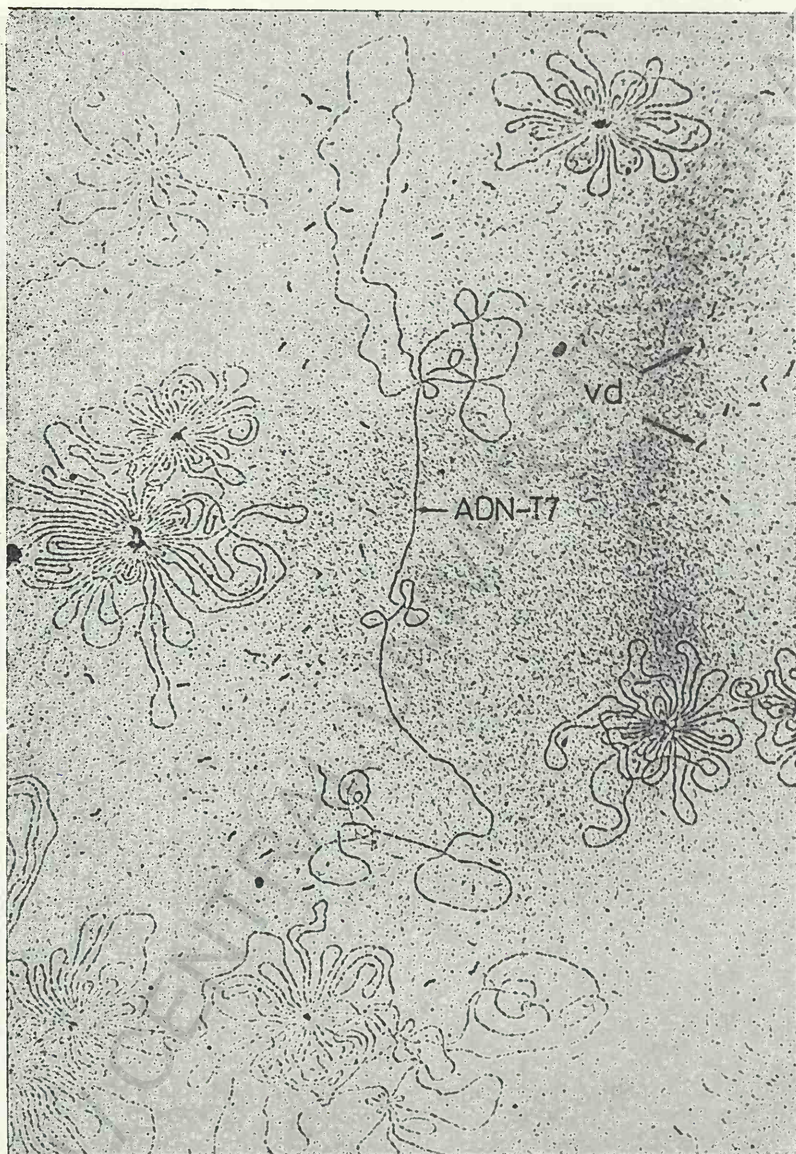




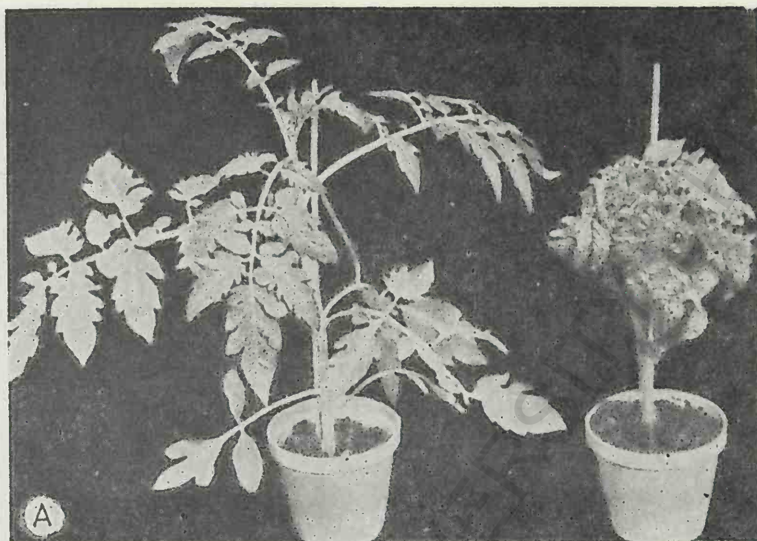


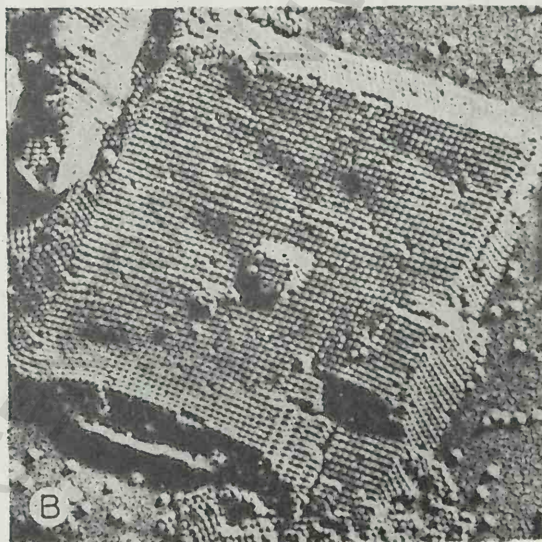
Pl. 23 — Virusul papilomului Shope. Microelectronografie evidenţiind structura complexă a capsidei (A) şi capside „goale" neinfecţioase, parţial sau complet dezintegrate, permiţind evidenţierea capsomerelor (B) (după Huguenau, 1967).

Oncornavirus — micrografia virionilor coloraţi cu fosfotungstat de sodiu. C. În nucleoidul sferic se văd scurte segmente de nucleoproteine. D. Nucleoidul sferic prezintă o dublă structură helicală (Ø 80 nm), după cum se vede în diagrama alăturată virionului, la baza săgeţii (după Sarkar şi colab., 1971).

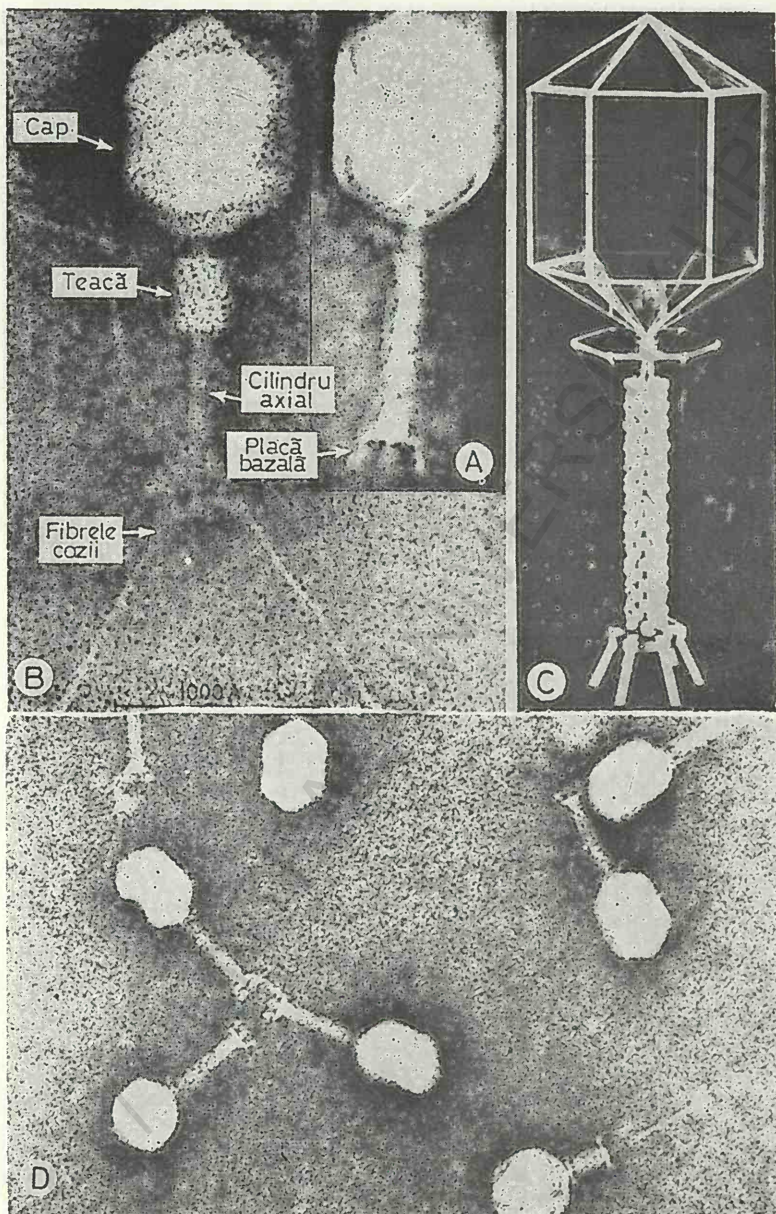


Pl. 24 — Viroidul cartofului (vd) (0,4 μg/ml) amestecat cu ADN d.c. provenit de la fagul T7 (0,8 μg/ml). Se observă că ADN-T7 şi ARN viroidal au grosimi asemănătoare (după Koller şi Sogo, 1973).



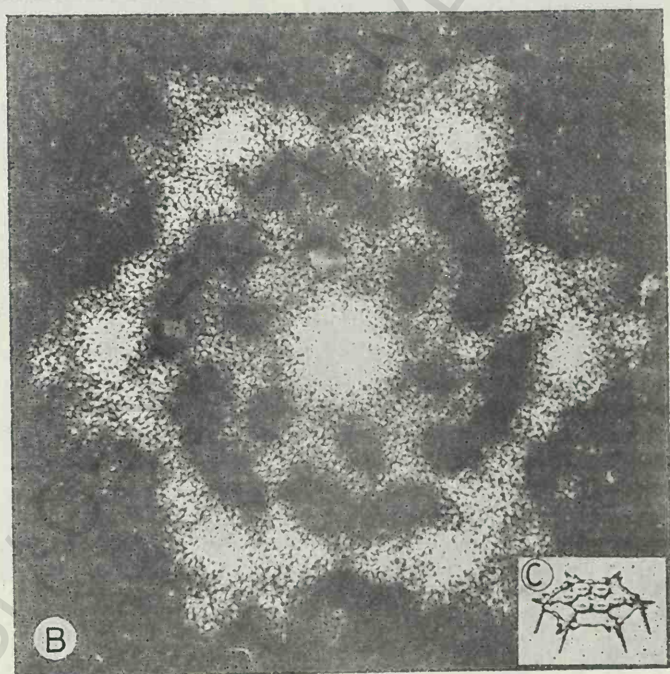


Pl. 25 — A. Simptomele produse de infecțiile viroidale. Aspectul plantelor de tomate sănătoase (stînga) comparativ cu cel al plantelor bolnave (după Sänger, din Gross și Riesner, 1980).
B. Virusul necrozei tutunului. Dispoziția moleculelor în cristalele de virus-proteină (microelectronografie — după Labaw, 1969).

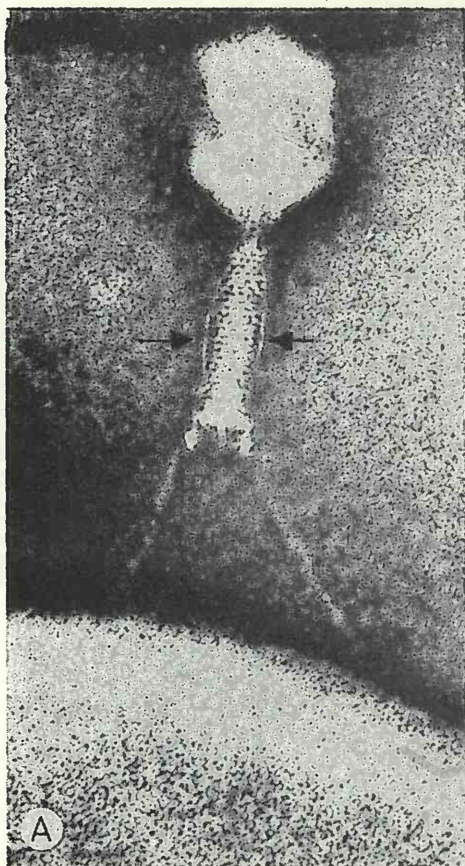


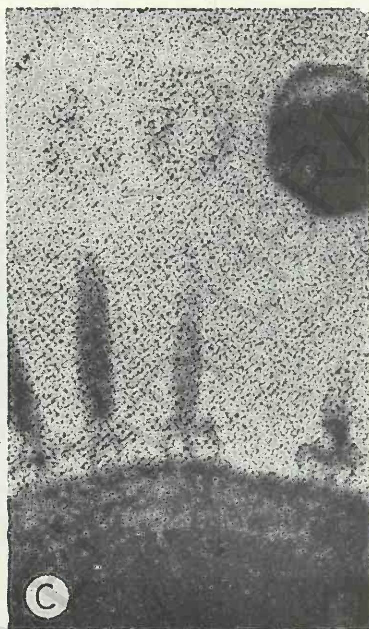
Pl. 26 — Microelectronografia fagului T4 înainte (A) și după contracția cozii (B). C. Model de structură a fagului T4 (după Bradley, 1967). D. Fagi T4 (microelectronografie după colorație negativă, evidențiind în special placa bazală și croșetele) (după Epstein și colab., 1963).

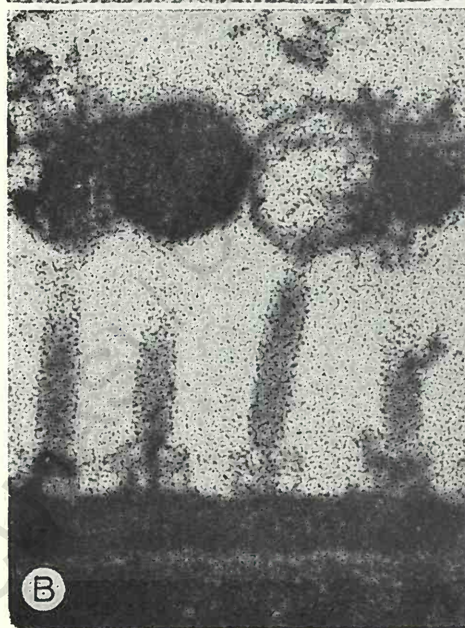




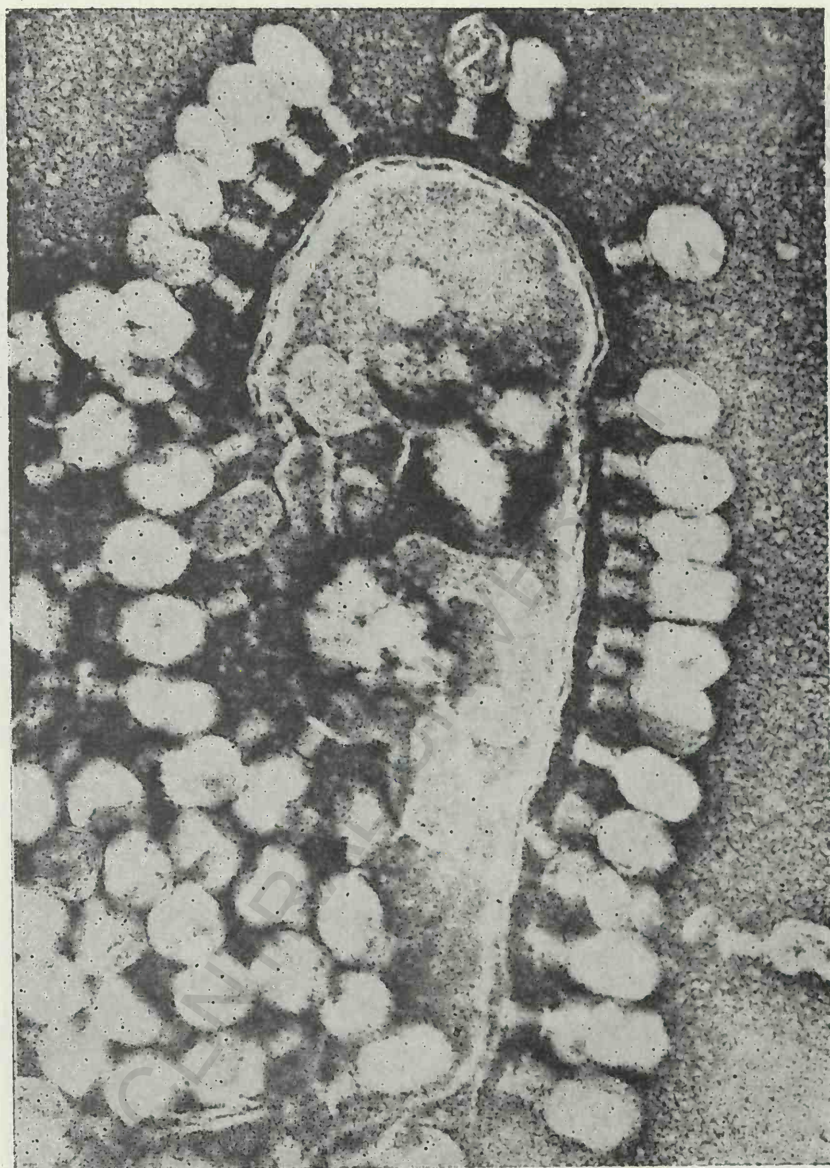
Pl. 27 — A. Structura hexagonală a plăcii bazale a fagului T4 (Haselkorn, 1975). B. Imaginea unei plăci bazale colorată negativ şi examinată după tehnica lui Crowther şi Amos. C.. Reprezentarea schematică a structurii sale.







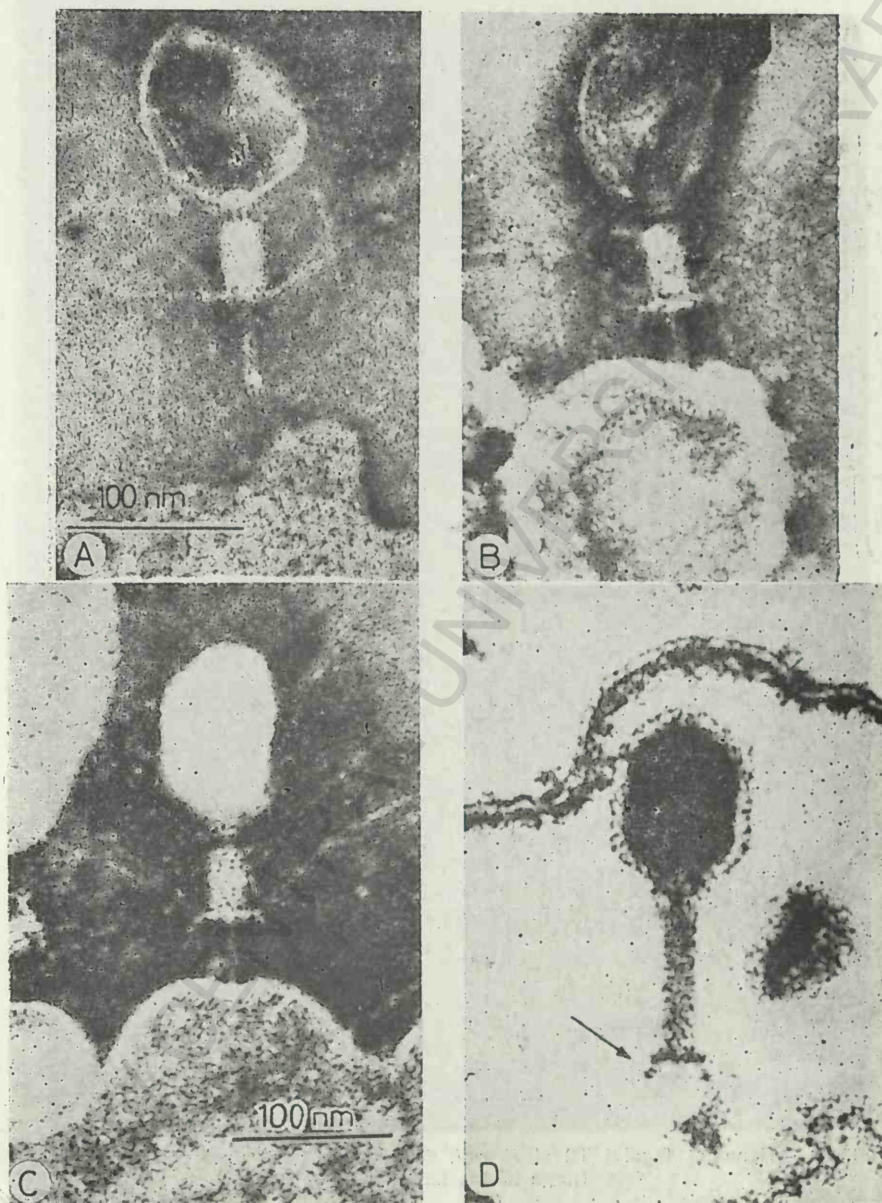
Pl. 28 — **A.** Faza inițială de adsorbție a fagului T2 pe *E. coli*, evidențiind fibre ale cozii, aderînd de peretele celular și alte două (marcate cu săgeți) paralele cu teaca cozii (după Hoagland, 1968). **B. C.** Faza de fixare: fagii sînt dispuși pe suprafața peretelui celular și fixați de acesta prin intermediul croșetelor plăcii bazale (după Simon, 1967).



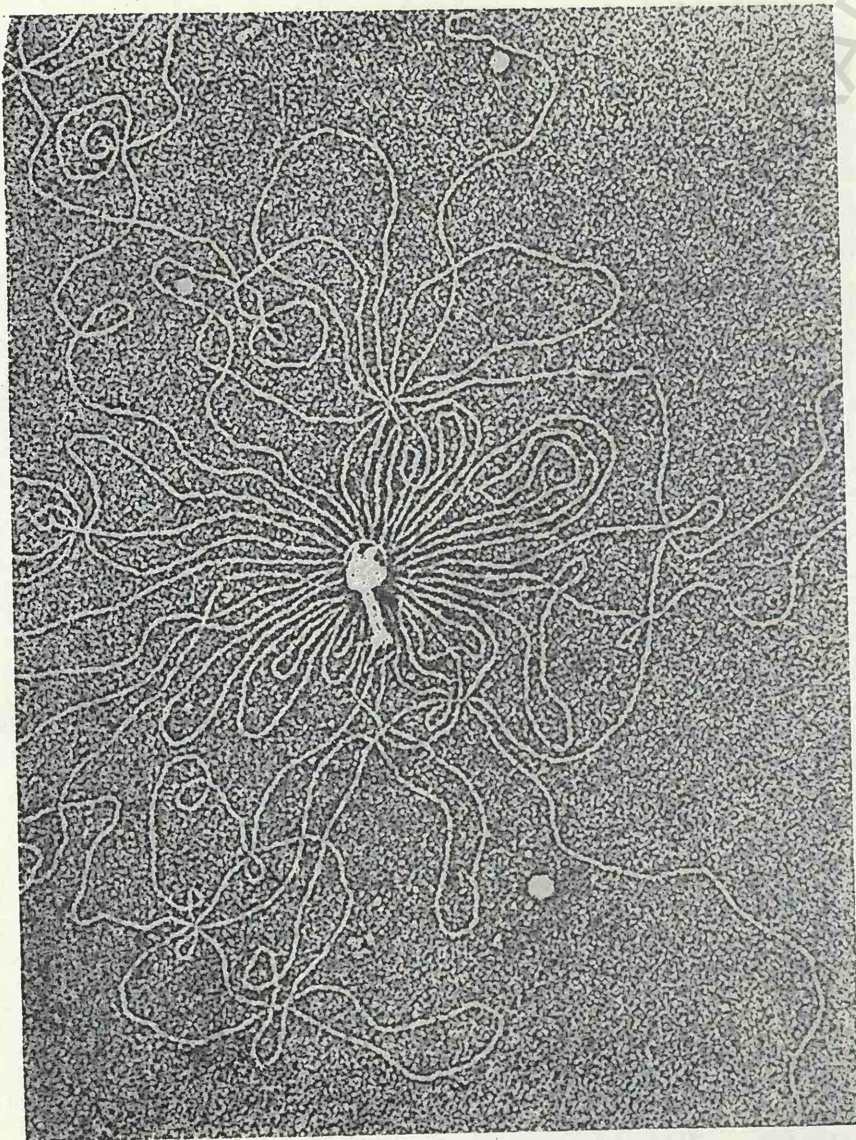
Pl. 29 – Fagi din seria T-par fixaţi pe suprafaţa bacteriei *E. coli* (microelectronografie din Bradley, 1967).



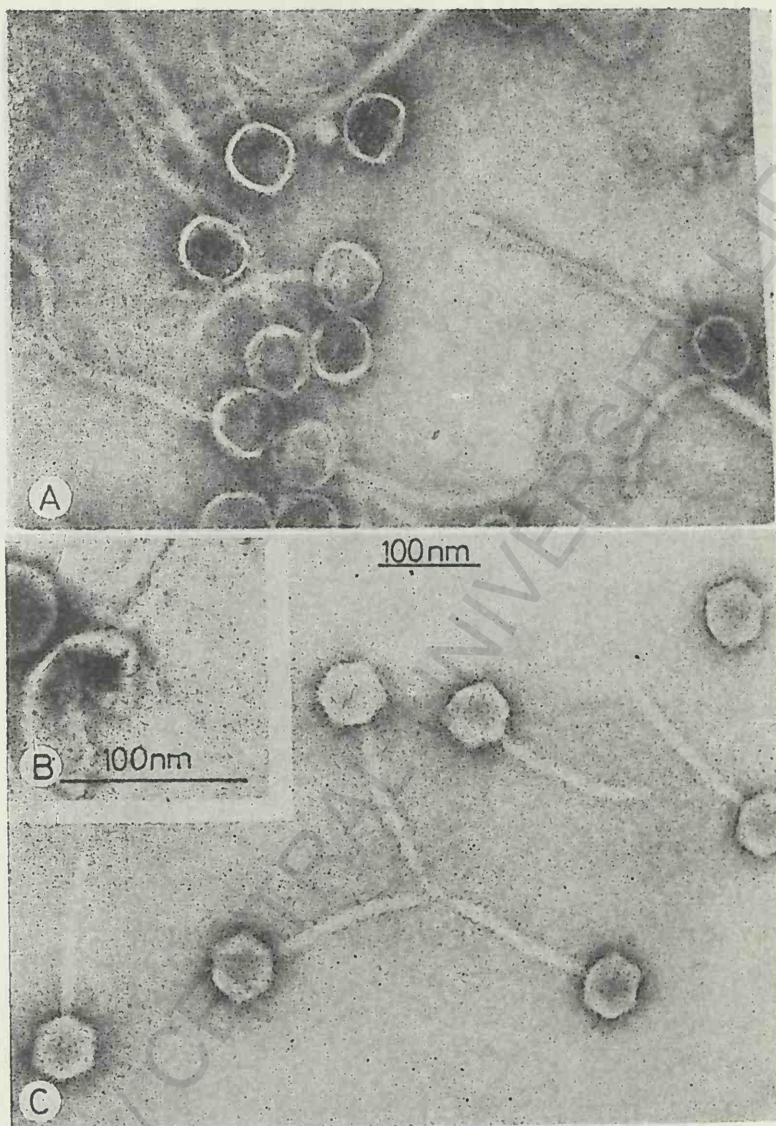
Pl. 30 — Injectarea acidului nucleic fagic prin peretele celular al bacteriei *E. coli* (după Simon, 1967).



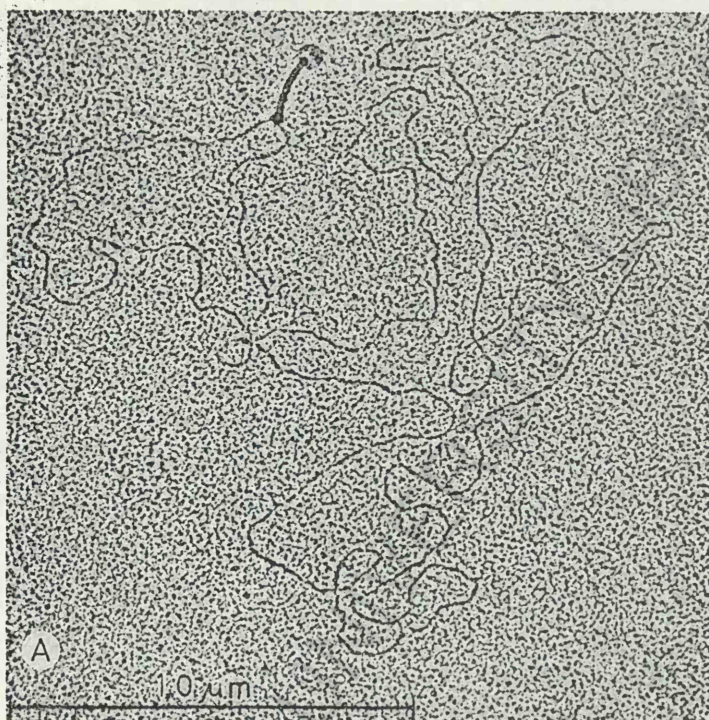
Pl. 31 — Diferite faze în adsorbția fagilor pe peretele celular bacterian, evidențiind structura cozii contractate, fibrele cozii și cilindrul axial (după Anderson, 1967).



Pl. 32 — Genomul fagului T2 al *E. coli*, dispersat în jurul unei particule virale (după Kleinschmidt, 1962).

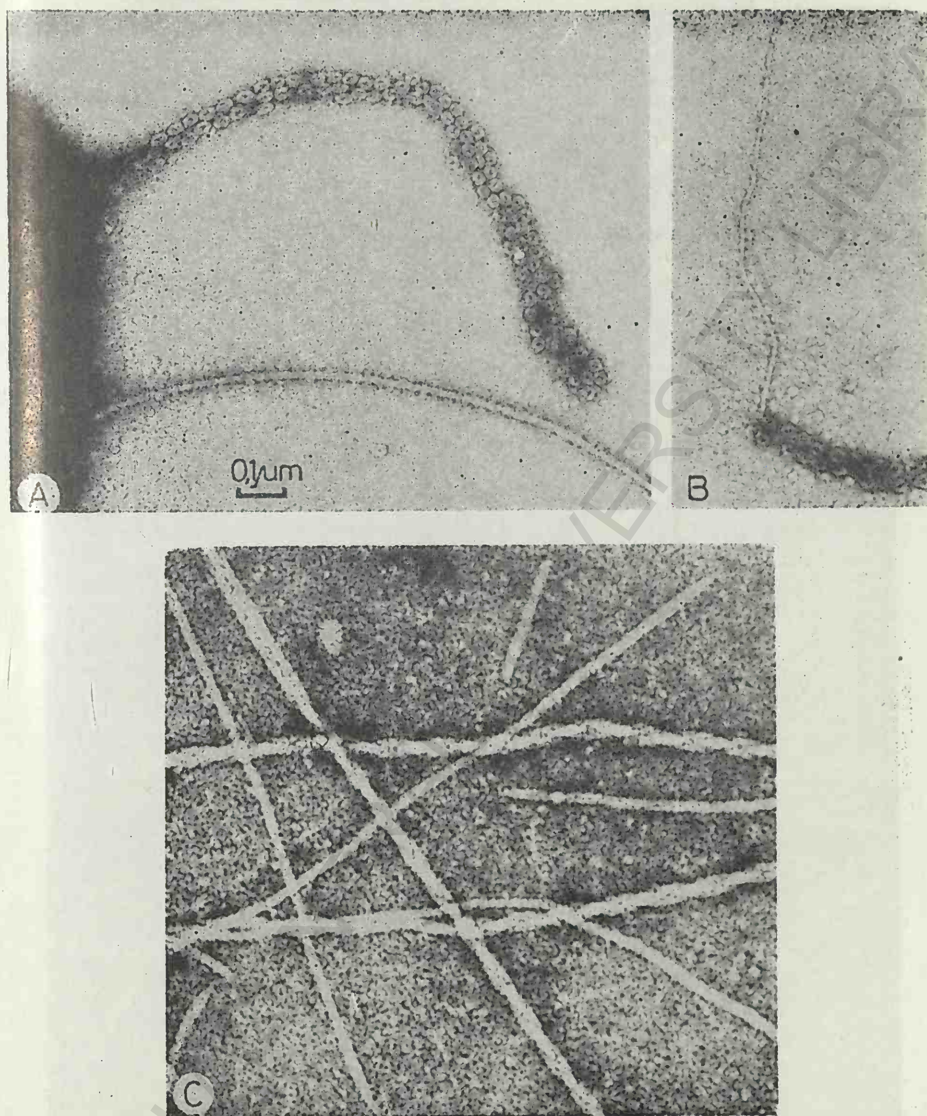


Pl. 33 — Fagul λ al *E. coli* (A). B. Fragment de cap fagic evidenţiind structura capsidei şi a cozii. C. Fagi λ cu capetele golite de genomuri (din Bradley 1967).

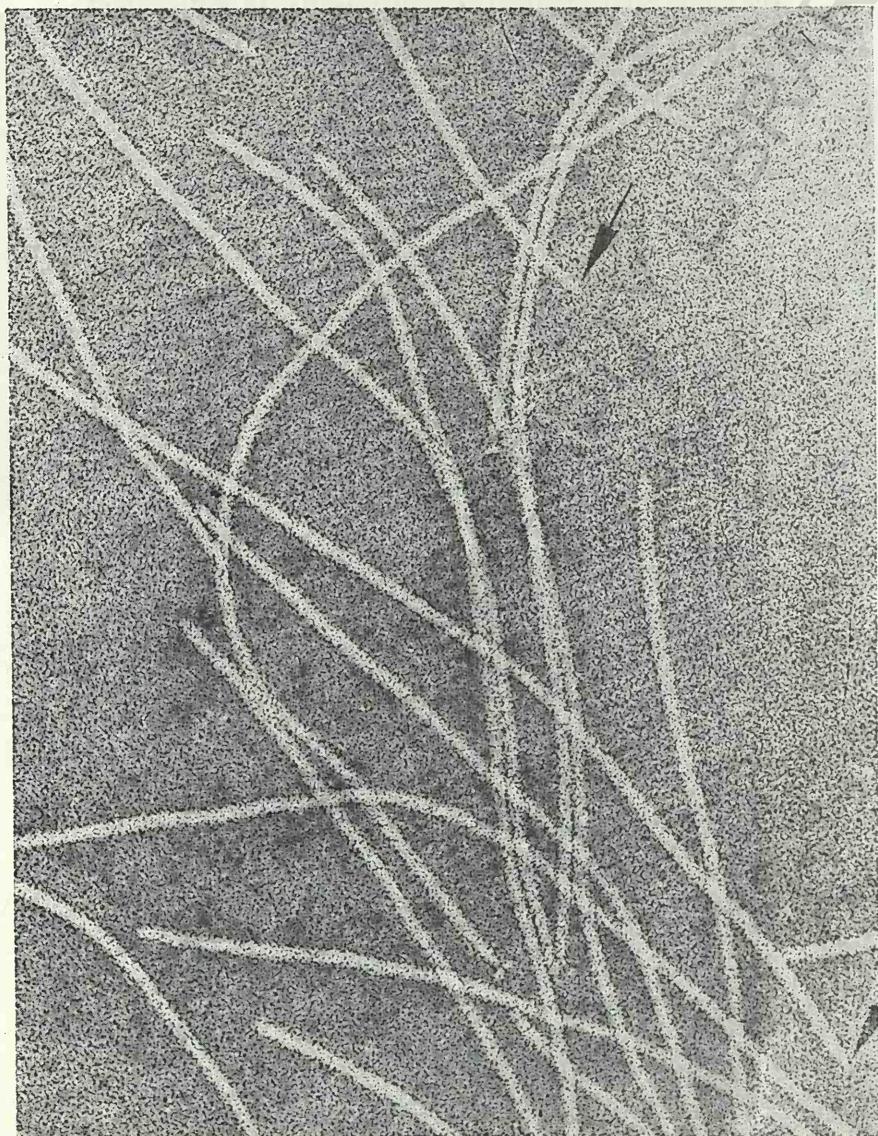




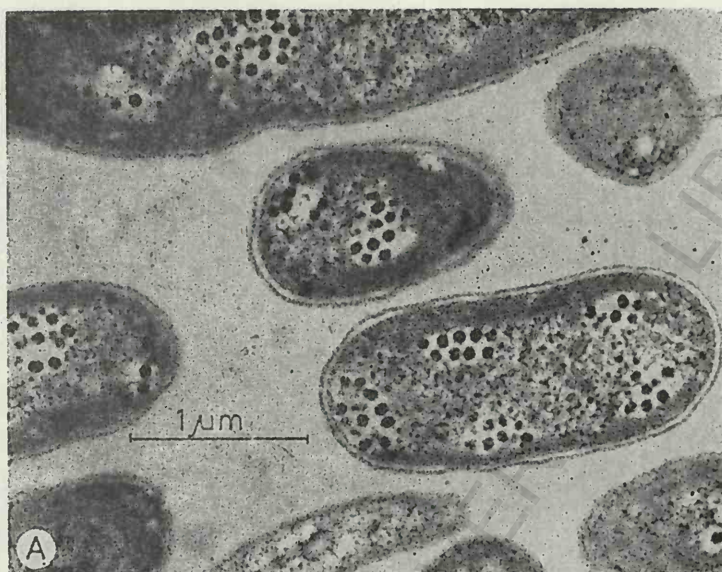
Pl. 34 — A. Fag λ din care genomul ADN a fost eliberat din capsidă. B. Actinofagul MSP2 de la *Streptomyces venezuelae* (după Bradley și Donna Ritzi, 1967).

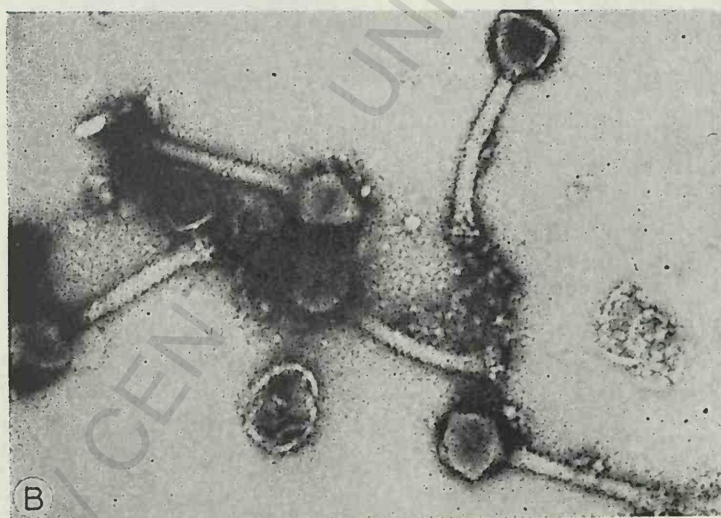


Pl. 35 — A. Fagi ARN ♂ adsorbiți pe suprafața pililor bacterieni (după Brinton, 1963). Pilul F al *E. coli* este marcat prin adsorbția pe suprafața sa a fagului MS2. În regiunea inferioară se observă un flagel. B. Pil F marcat cu fagul MS2 avînd adsorbit la extremitatea sa liberă fagul filamentos M13 (după Meynell și colab., 1968). C. Fagi filamentoși de *Pseudomonas aeruginosa* (după Takeya și Amako, 1966).

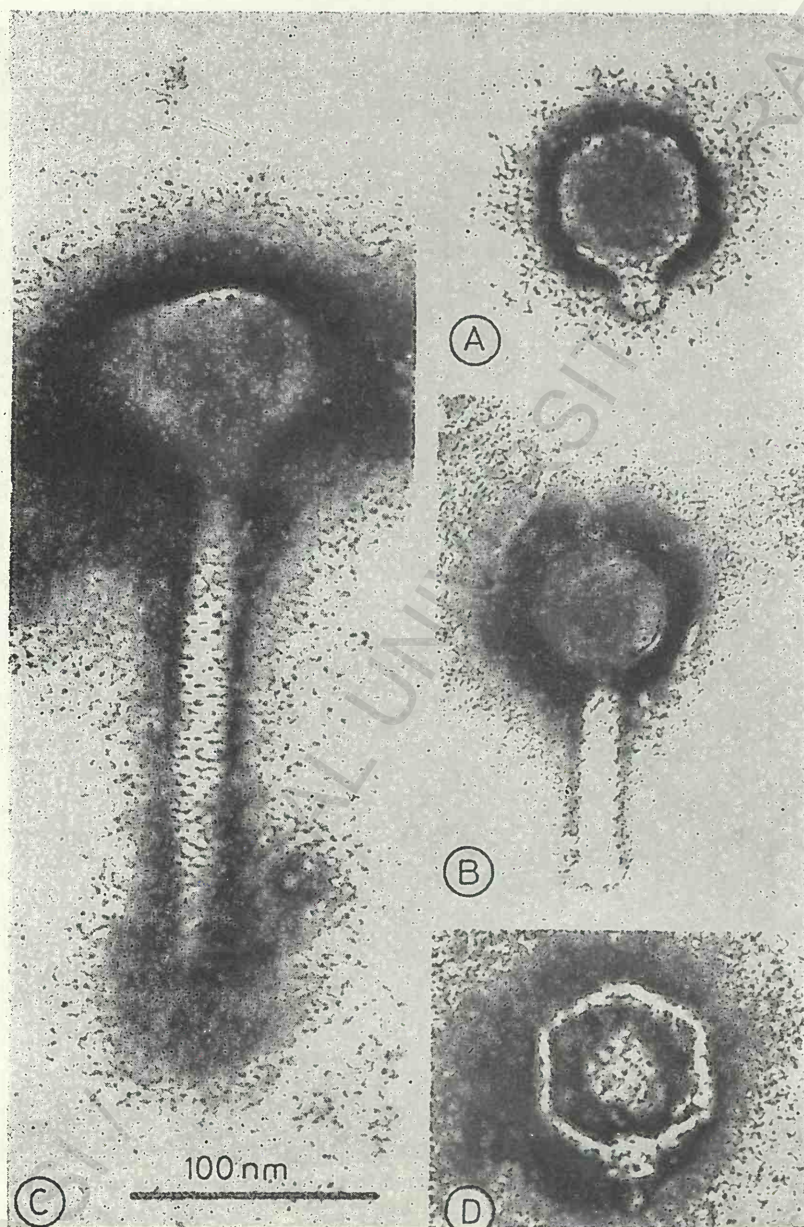


Pl. 36 — Microelectronografia fagului M13 al *E. coli.* Unele filamente indicate prin săgeţi sînt ascuţite la una din extremităţi (după Williams, din Kornberg, 1980).

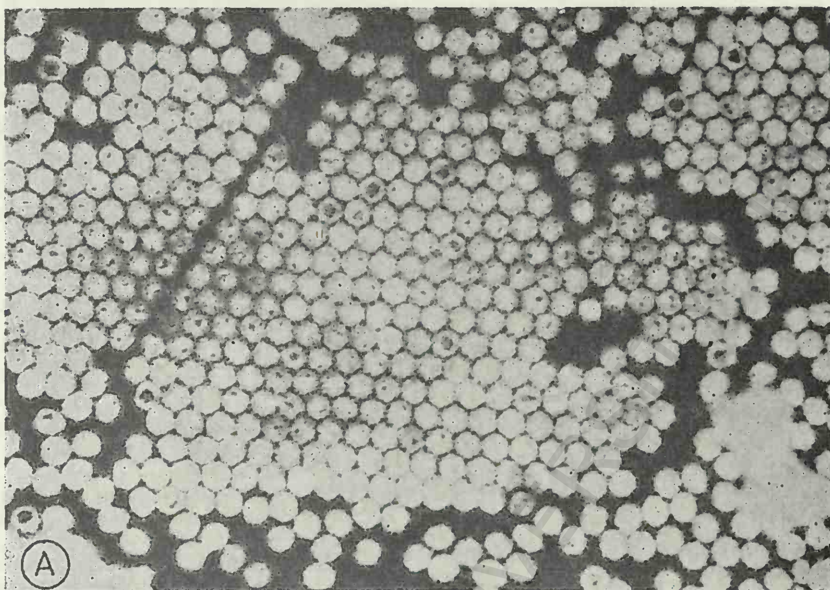


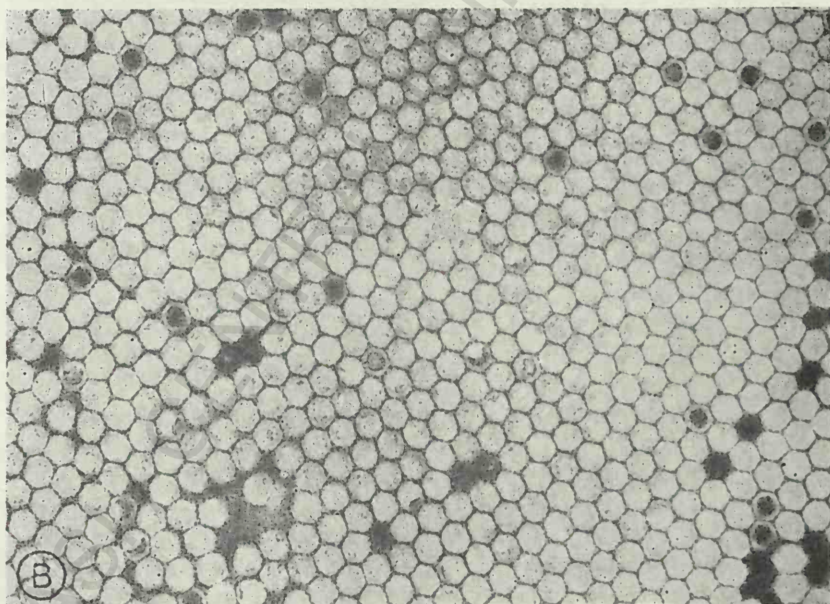


Pl. 37 — A. Cianobacterie infectată cu cianofagul SM-1. B. Cianofagi liberi după liza bacteriei-gazdă (după Mackenzie și Haselkorn, 1972).



Pl. 38 – Morfologia cianofagilor. Cianofagii LPP-1G (A), N-1 (B), AS (C), SM (D) (după Shilo, 1973).





Pl. 39 — A. Preparat purificat de particule virale izolate de la *Penicillium stolonifer* (după Spire, 1971). B. Virioni izolați de la *Piricularia oryzae*. Microelectronografie după colorare cu fosfotungstat de potasiu (după Yamashita și Doi, din Lemke și Nash, 1974).

Datorită faptului că conținutul în ADN al fiecărui cap depășește cu 2% lungimea genomului („headful genome")*), moleculele de ADN T4 prezintă extremitățile redundante și permutarea circulară caracteristică**). Cantitatea fixă de ADN care este inserată în capul fagului este determinată printr-un mecanism specific, a cărui existență este bazată pe date genetice certe („headfull cutting mechanism") (Streissinger, 1976), realizat prin acțiunea unei endonucleaze specifice, produs al genei fagice nr. 49 (fig. 103).

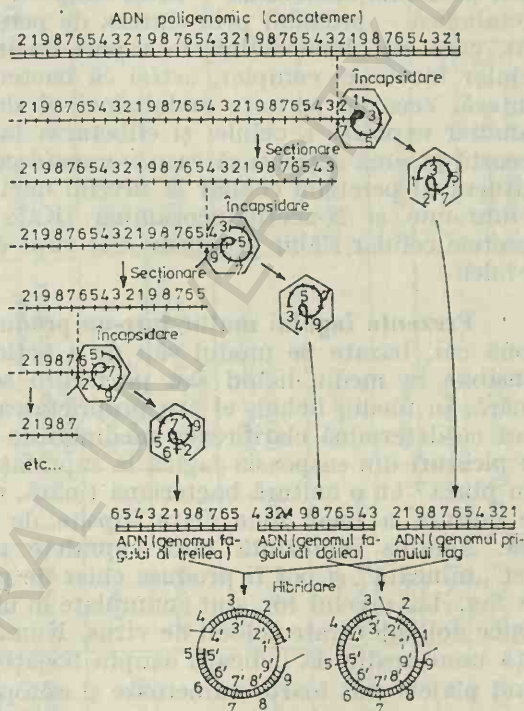


Fig. 103. — Schema încapsidării ADN fagic T4. Cantitatea de ADN pe care o poate încapsida un cap fagic provine dintr-o moleculă de ADN poligenomică (ADN concatemer) și este cu puțin superioară lungimii genomului ceea ce explică formarea redundanțelor terminale. ADN din fiecare fag progen conține totdeauna aceleași gene, dar într-o ordine diferită, care decurge din permutarea lor circulară. Moleculele omoduplex formate prin denaturarea și renaturarea ADN fagic sînt circulare (după Gross și Hirth, 1980).

Concomitent cu „împachetarea" ADN precapul se mărește, crescînd în volum cu 40—100 %.

După încapsidarea și secționarea ADN, structura capului este desăvîrșită, prin modificarea gîtului sub acțiunea produșilor a una sau mai multe gene, în așa fel încît cozile pot fi adăugate fie prin încorporarea *in situ* a produșilor genelor specifice ale cozii, fie, mai ales, prin legarea cozilor terminate, produse pe o cale independentă de asamblare (Murialdo și Becker, 1978).

---

*) *Headful* (engleza medie) = care conține cît mai mult posibil, atît cît poate cuprinde un spațiu dat, pentru a fi umplut.

**) Mărimea genomului T4 este de 166 perechi de kilobaze (Kbp), iar mărimea moleculei de ADN „împachetată" într-un cap fagic este de 169 Kbp, ceea ce corespunde unei redundanțe de 3 Kbp.

Liza bacteriei și eliberarea fagului. Multiplicarea fagului se încheie brusc prin liza celulei bacteriene și eliberarea conținutului ei în virioni după circa 22—25 minute de la infecție. Liza pare să fie determinată în cea mai mare parte de acțiunea unei enzime — *endolizina* — similară lizozimului, a cărei sinteză în celula bacteriană este indusă de prezența fagului. Deși primele molecule de endolizină pot fi detectate în bacteriile infectate cu fagul T4 chiar după 8 minute de la infecție, acumularea lor continuă pînă în ultimul moment. Dizolvarea peretelui celular este împiedicată de celula bacteriană — atîta timp cît ea mai desfășoară o activitate metabolică — probabil prin sinteza de perete celular nou. La un moment dat, care este bine definit în raport cu inițierea infecției, metabolismul celular încetează complet, astfel că bacteria nu mai face nici un fel de sinteză, ceea ce permite endolizinei să determine distrugerea masivă cu caracter exploziv a celulei și eliberarea fagului matur. La fagul T-par, această enzimă acționează ca o *muramidază*, catalizînd clivajul unui constituent al peretelui celular la nivelul unei legături între acidul N-acetil-L-muramic și N-acetilglucozamină (Katz și Weidel, 1965), prin care peretele celular slăbit progresiv este rupt de presiunea osmotică internă a celulei.

Prezența fagului matur într-un produs poate fi pusă în evidență pe două căi, bazate pe modul său de a acționa asupra culturii bacteriene sensibile, în mediu lichid sau pe mediu solid: 1) adăugat la o cultură tînără, în mediu lichid, el are proprietatea de a liza celulele bacteriene, ceea ce determină clarificarea mediului de cultură; 2) aplicat sub formă de picături din suspensia fagică la suprafața unui mediu solid însămînțat „în pînză" cu o cultură bacteriană tînără, el determină formarea în pînza de cultură a unor zone clare, lipsite de creștere bacteriană, *plajele de liză*. Acestea reprezintă mici suprafețe circumscrise în care cultura a fost „mîncată" și pot fi produse chiar de prezența unei singure particule de fag. La nivelul lor sînt acumulate în urma lizei numeroase particule fagice noi, adevărate colonii de virus. Numărul plajelor formate pe suprafața unui mediu dă indicații asupra bogăției produsului respectiv în fagi. Cînd plajele sînt foarte numeroase și apropiate între ele sau foarte mari, ele se ating și se unesc, dînd aspectul de liză confluentă.

Taxonomia fagilor

Fagii cunoscuți sînt grupați în 17 grupuri sau tipuri morfologice, însă aranjarea lor pe criteriile taxonomiei virale este în curs de efectuare. Cei mai mult studiați sînt fagii care infectează specia *E. coli* (tabelul nr. 10).

În prezent ei sînt grupați în 10 familii, după cum urmează:

1) Familia *Myoviridae* (gr. *myos* = mușchi) cuprinde fagii cu cozi contractile, lungi și complexe, genom ADN d.c. (g.m. $\sim 120 \cdot 10^6$ dal), permutat circular și terminal redundant.

Genul: T-par; specia tip: T2; gazda: Enterobacteria.

Tabelul nr. 10

Caracteristicile principalilor bacteriofagi ai E. coli (după date din diferite publicaţii)

Fagul	Morfologie	Dimensiuni (nm)	Genom			Comportare faţă de gazdă	Durata perioadei de latenţă (min)	Ciclul de evoluţie la 37°C	
			Tip 1—m.c. 2—d.c.	g.m. 10^6 dal	Topologie			Randament mediu virioni	Lizogenie
λ	cap icozaedric coadă necontractilă	54 150×17	ADN-2	31	linear, extremităţi adezive	temperat	35	100	+
T4	cap icozaedric alungit, coadă compusă, contractilă, cu fibre	80×120 95×20	ADN-2	130	linear, permutat circular, terminal redundant,	virulent	21—25	150—400	—
T1	cap icozaedric coadă simplă	50 150×10	ADN-2	27	linear, repetiţii terminale	virulent	13	150	—
T5	cap octaedric coadă necontractilă	90 200	ADN-2	75	linear, repetiţii terminale	virulent	40	200	—
T7	cap octaedric coadă necontractilă	63 15×15	ADN-2	26	linear, repetiţii terminale	virulent	13	300	—
P1	cap icozaedric coadă contractilă	85 220×18	ADN-2	58	linear	temperat	45	80	—
ΦX174	icozaedru	25	ADN-1	1,7	circular	virulent	13	180	—
R17	icozaedru	25	ARN-1	1,1	linear	virulent	—	—	—
f1, fd, M13	filamentos	870×5	ADN-1	2,0	circular	replicare fără liză, eliberare prin peretele celular	30	100—200	—

2) Familia *Styloviridae* (gr. *stylos* = coloană) formată din fagi cu cozi lungi (50—540 nm) necontractile și genom ADN (g.m. $33 \cdot 10^6$ dal), cu extremități adezive, capabil de circularizare. Sînt fagi temperați capabili de evoluție litică sau de lizogenie.

Genul: λ; *specia tip*: *Colifagul* λ; *gazda*: *Enterobacteria*.

3) Familia *Pedoviridae* (gr. *pes-pedis* = picior) cuprinde fagi cu coadă scurtă, necontractilă și genom ADN (g.m. $25 \cdot 10^6$ dal) nepermutat, terminal redundant.

Genul: T-impar; specia tip: Colifagul T7; gazda: Enterobacteria.

4) Familia *Leviviridae* (l. *levis*=ușor) cuprinde fagi icozaedrici, care se adsorb pe laturile pililor de sex; formează șiruri cristaline în celula bacteriană. Genom ARN m.c. (g.m. $1{,}2 \cdot 10^6$ dal) linear.

Grupul fagilor ARN m.c. (♂)*; specia tip: fagul MS2; gazda: Enterobacteria.*

5) Familia *Microviridae* alcătuită din fagi icozaedrici, cu genom ADN m.c. circular (g.m. $1{,}7 \cdot 10^6$ dal).

Specia tip: fagul Φ X *174; gazda: Enterobacteria.*

6) Familia *Inoviridae* (gr. *inos* = mușchi) este formată din fagi cu forma de bastonașe flexibile, mulți specifici pentru bacteriile mascul; se adsorb lent pe extremitatea liberă a pililor de sex. Virionii sînt asamblați în membrana celulară și părăsesc bacteriile fără liză. Genom ADN m.c. (g. m. $1{,}9 - 2{,}7 \times 10^6$ dal) circular.

Specia tip: fagul filamentos fd; gazda: Enterobacteria, *Pseudomonas*, *Mycoplasma.*

7) Familia *Plasmaviridae* (gr. *plasma* de la plassein=a da o formă): fagi rotunzi, puțin pleomorfi, cu genom ADN d.c. circular, superhelical.

Specia tip: fagul tip 2 Mycoplasma.

8) Familia *Cystoviridae* (gr. *Kystis* = vezică) cuprinde fagi izometrici cu capsidă cubică și înveliș flexibil care conține lipide. Se adsorb pe părțile laterale ale pililor; genom segmentat, 3 bucăți de ARN d.c. linear (g.m. $10{,}4 \cdot 10^6$ dal).

Specia tip: fagul Φ *6; gazda: Pseudomonas.*

9) Familia *Corticoviridae* (l. *cortex* = scoarță, coajă), fagi icozaedrici cu spicule la vertexuri, capsida multistratificată; genom ADN d.c. circular, superhelical.

Specia tip: fagul PM2; gazda: Pseudomonas.

10) Familia *Tectiviridae* (l. *tectus* = acoperit) cuprinde fagi icozaedrici, cu spicule lungi (20 nm) la vertexuri; genom ADN d.c. linear (g.m. $7{,}4 \cdot 10^6$ dal), capsidă dublă cu un înveliș extern rigid și unul intern flexibil (10—20 % lipide). Se adsorb pe extremitatea pililor de sex.

Specia tip: fagul PRD1; gazda: Pseudomonas, *Vibrio*, *Bacillus.*

Importanța fenomenului de bacteriofagie

Bacteriofagii sînt foarte răspîndiți în natură, fiind întîlniți practic în toate mediile în care se găsesc bacterii: apă, sol, organisme umane și animale etc.

Fagii au un rol deosebit în ecologia și evoluția bacteriilor. Ei pot grăbi mult procesele foarte lente ale evoluției pe calea selecției naturale, acționînd ca un factor important de variabilitate a bacteriilor, grație fenomenului de transducție genetică (transferul prin intermediul fagului temperat al unui fragment de material genetic bacterian de la o bacterie la alta, diferite genetic).

Fagii există și se mențin în natură în special ca fagi temperați, găzduiți sub formă de *profagi* în celule lizogene. Dar, deoarece trec uneori în faza vegetativă cu eliberare de fagi litici, ei contribuie în anumite medii la reducerea numerică a populațiilor sensibile. În medicină, acțiunea bacteriolitică a fagului este folosită pentru tratamentul unor infecții locale, în special urinare, în multe cazuri cu rezultate bune. În industria fermentativă, apariția unui fag virulent capabil să lizeze tulpinile de microorganisme utilizate în fermentații sau biosinteze poate produce pagube însemnate. Specificitatea relației fag—bacterie a făcut posibilă elaborarea unui procedeu de identificare și clasificare a bacteriilor în funcție de sensibilitatea lor față de un anumit fag sau grup de fagi, procedeu denumit *lizotipie* sau *tipizare prin fag*, larg folosit în diagnosticul bacteriologic și în studiile de sistematică bacteriană, care permite subdivizarea biotipurilor sau serotipurilor unei specii în tipuri fagice. Tipizarea prin fag este un instrument foarte util în epidemiologie pentru a trasa originea și circulația infecției în colectivitate, în cursul unei epidemii. Practic, toate tulpinile de bacterii patogene izolate de la bolnavi, purtători de germeni, alimente contaminate, vectori sau animale care acționează ca izvor de infecție în cursul unei epidemii, *avînd o origine comună*, aparțin aceluiași tip fagic. Tipizarea prin fag este folosită pentru a caracteriza o serie de aspecte de finețe în taxonomia bacteriană, ca și în numeroase domenii de cercetare fundamentală și aplicată.

Transfecția

Infectarea celulelor direct de către un acid nucleic viral (eliberat din capsidă), avînd ca rezultat producerea de particule virale mature este cunoscută sub denumirea de *transfecție* (Földes și Trautner, 1964).

Procesul a fost cel mai bine studiat în sistemul fag—bacterie, în care au fost descrise patru modalități diferite de transfecție (Trautner, 1973), (fig. 104).

Transfecția prin sistemul fag λ-helper a fost descrisă utilizînd ADN provenit din fagul λ — dg și ca gazdă *E. coli*. În acest sistem, bacteriile lizogene gal^- pot fi transformate în celule gal^+, dacă sînt expuse transfecției prin ADN λ—dg (Kaiser și Hogness, 1960). Ulterior, s-a demonstrat că înglobarea ADN prin transfecție este condiționată de infecția suplimentară, accidentală, cu un fag λ-helper intact (particulă

virală matură) a cărui replicare în bacteria respectivă nu era posibilă din cauza imunității celulare.

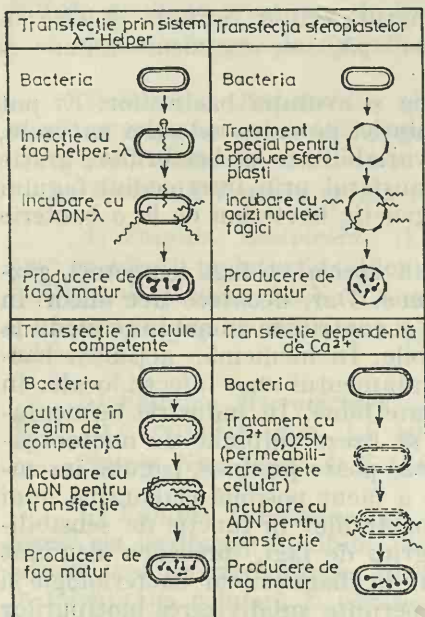


Fig. 104. — Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de transfecție (modificat după Trautner, 1973).

Nu se cunoaște mecanismul prin care fagul λ-helper favorizează procesul de transfecție : virusul helper ar putea produce „găuri" ad-hoc, perforînd peretele celular, prin care ar pătrunde și ADN de transfecție, sau ar asigura transmiterea prin asocierea propriului său genom cu molecula de ADN care produce transfecția la nivelul extremităților lor monocatenare complementare („extremitățile adezive"). Dovada o constituie faptul că virusurile helper nu favorizează transfecția moleculelor de ADN ale căror extremități adezive nu au secvențe complementare față de cele ale genomului lor.

Transfecția sferoplaștilor se bazează pe observația lui Stent (1963) că, îndepărtarea peretelui celular la bacterii — după ce infecția fagică s-a produs — nu afectează replicarea fagilor. Sferoplaștii obținuți după tratamente adecvate ale celulei de *E. coli* pot fi infectați cu o serie de acizi nucleici izolați, fie din fagi ARN (M-12), fie din fagi ADN (M-13, Φ X 174, λ sau T4), cu condiția de a fi menținuți în medii hipertonice, pentru a preveni liza prin șoc osmotic. Sferoplaștii bacterieni infectați eliberează, de regulă, mai puțini fagi decît celulele normale.

Transfecția celulelor „competente". Bacteriile cultivate în condiții care le fac „competente" de a îngloba ADN prin procesul de transformare genetică devin apte să sufere un proces de transfecție sub acțiunea acizilor nucleici proveniți de la fagii care le infectează în condiții naturale. În acest caz, deci, transfecția este condiționată de aceiași factori care determină „competența" în procesul de transformare genetică.

Transfecția dependentă de ionii de calciu este folosită curent în experiențele de inginerie genetică la bacterii, pentru a mări permeabilitatea învelișurilor celulare față de ADN de diferite proveniențe prin pretratare cu 0,025 M Ca^{2+}. A fost demonstrată inițial la *E. coli* cu ADN din fagi λ și P2.

Semnificația biologică a transfecției. Procesul de transfecție confirmă experiențele lui Hershey și Chase (1952) și demonstrează că genomul viral conține toată informația genetică necesară pentru formarea întregii particule virale.

În cazul fagilor, ADN sau ARN fagic singur poate iniția și dirija întregul proces de infecție litică, asigurînd propria sa replicare, sinteza proteinelor fagice și asamblarea lor în particule virale mature, precum și eliberarea acestora.

Transfecția fagică poate fi efectuată și cu bacteriile rezistente la fagi. Ea a fost studiată pînă în prezent la *E. coli*, *B. subtilis* și *Haemophylus influenzae*. În condiții de laborator, prin procesul de transfecție se poate extinde spectrul de gazde sensibile față de un virus dat: ARN de poliovirus poate infecta și celule animale în mod normal rezistente față de virus, datorită absenței receptorilor pentru capsida virală. Aceasta demonstrează că celulele „rezistente" față de un virus sînt în realitate capabile să asigure replicarea acestuia, dacă genomul său izolat găsește o cale de a le infecta, înainte de a fi degradat și că citotropismul și specificitatea virusurilor pentru anumite celule sînt determinate în primul rînd de o specificitate de fixare pe anumiți receptori de virus.

Fagul lambda λ

(Pl. 33, 34)

Fagul λ diferă mult ca morfologie de fagii din seria T-par. El are un cap mult mai mic (~ 55 nm), icozaedric și o coadă mai lungă (~ 150 nm) mai subțire și mai flexibilă, care se îngustează progresiv spre extremitatea sa liberă, terminîndu-se cu o singură fibră fină, scurtă. Este lipsit de placă bazală. Coada este o structură goală în interior, necontractilă, formată din 35 de discuri suprapuse.

Genomul fagic este alcătuit dintr-o moleculă de ADN d.c. lineară, lungă de 17 μm (g.m. 31.10^6dal), care conține ~47 000 perechi de baze, respectiv ~ 50 gene. Cele două extremități ale genomului ADN d.c. au o particularitate neobișnuită, decurgînd din faptul că ele se termină la capătul 5′, cu extremități monocatenare, lungi de 12 nucleotide complementare a căror secvență este cunoscută. Astfel, capătul 5′ terminal stîng are secvența G G G C G G C G A C C T, iar capătul terminal 5′ drept are o secvență complementară C C C G C C G C T G G A. Datorită acestei particularități, cînd ajung în celula bacteriană aceste extremități se pot uni și lega pe bază de complementaritate prin legături de H, permițînd conversia moleculei lineare într-o moleculă circulară.

Prin această proprietate, extremitățile m.c. complementare ale ADN λ, numite extremități mature (m și m′), sînt cunoscute mai ales sub denumirea de „extremități adezive" sau „lipicioase"*) (Ris și Chandler, 1963).

Genomul fagului λ are ~ 50 de gene, dintre care 20 (incluzînd genele A — J), situate în partea stîngă a genomului (fig. 105), conțin 55% G + C și codifică proteine active în morfogeneză. Celelalte 30, situate în brațul drept al ADN, au un conținut de 45% G + C și au rol în special de reglare în transcrierea, traducerea și interacțiunea genomului λ cu cel

---

*) Extremitățile adezive complementare furnizează un mecanism prin care se pot lega specific cele două capete ale unei molecule de ADN, asigurînd circularizarea acesteia, sau două sau mai multe molecule de acest gen în dimeri, trimeri etc.

al celulei-gazdă. Unele gene sînt transcrise după o catenă, altele după cealaltă catenă şi în direcţie opusă.

Organizarea genetică a fagului λ reflectă o mare economie de utilizare a ADN, decurgînd din gruparea genelor cu funcţii similare (de ex. genele structurale şi morfogenetice) şi apropierea genelor care codifică proteinele

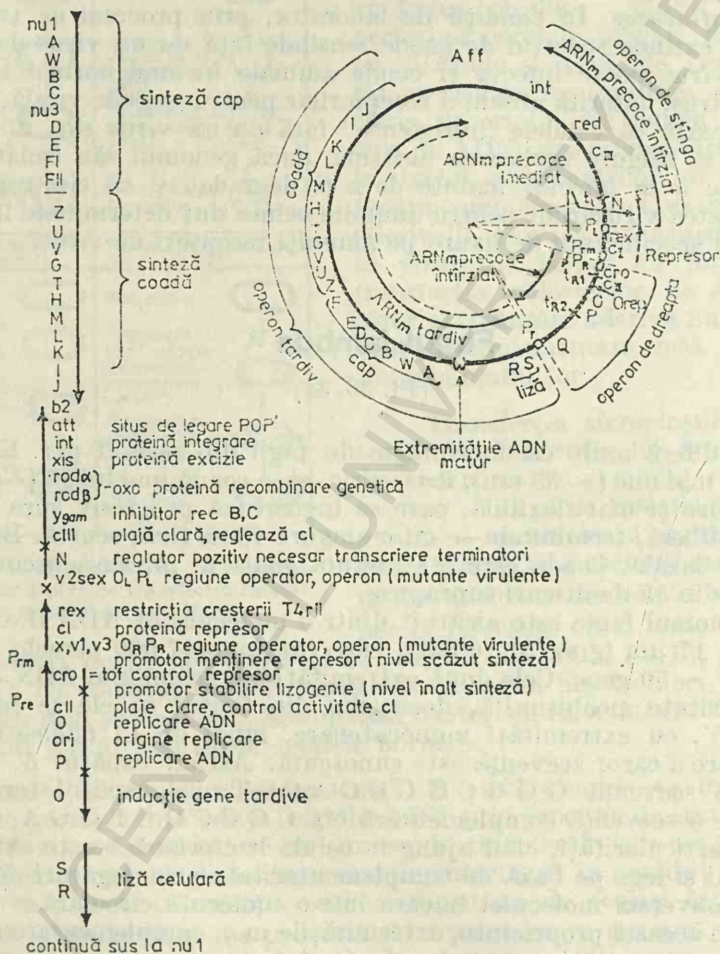


Fig. 105. — Harta genetică a fagului λ în formă lineară şi după circularizare. Săgeţile indică direcţia în care este citită informaţia genetică, cu menţionarea funcţiei principalilor determinanţi genetici (după Echols şi Murialdo, 1978).

care acţionează asupra ADN de situsul lor de acţiune. Acest tip de organizare conferă o serie de avantaje biologice : a) simplificarea proceselor de reglare a dezvoltării fagului, deoarece cu un număr limitat de proteine de reglare şi situsuri pot fi controlate un număr mare de gene, ai căror produşi acţionează împreună, cel puţin un timp ; b) genele pentru proteine care trebuie să se recunoască între ele sînt rar separate prin recombinări ;

c) evoluţia unor noi specii de fagi este facilitată de posibilitatea schimbului prin recombinare a unor „moduluri" funcţionale de gene (spre ex., un fag poate dobîndi o nouă coadă, cu proprietăţi diferite de adsorbţie, odată cu legarea setului de gene învecinate, prin recombinare genetică). În plus, sinteza proteinelor aproape de sediul activităţii lor conferă un plus de potenţial cinetic, deoarece ele pot acţiona, fără să mai difuzeze înainte de a ajunge la ţintă, printr-o serie de interacţiuni nespecifice.

Natura relaţiilor dintre fagul λ şi bacteria-gazdă

Spre deosebire de fagii T-par care sînt virulenţi şi produc liza tuturor celulelor pe care le infectează, fagul λ, descoperit de Lederberg (1951) la *E. coli K-12*, este un *fag temperat* (Lieb, 1951), care are două căi posibile de evoluţie după infecţia celulei bacteriene: 1) *calea litică*, implicînd replicarea şi morfogeneza fagului urmată de liza bacteriilor şi 2) *calea lizogenă*, în care celula bacteriană supravieţuieşte, deoarece genomul fagic este integrat în cromosomul bacterian ca *profag* (Lwoff, 1952), fiind replicat la fiecare diviziune celulară ca o parte a cromosomului gazdei (fig. 106).

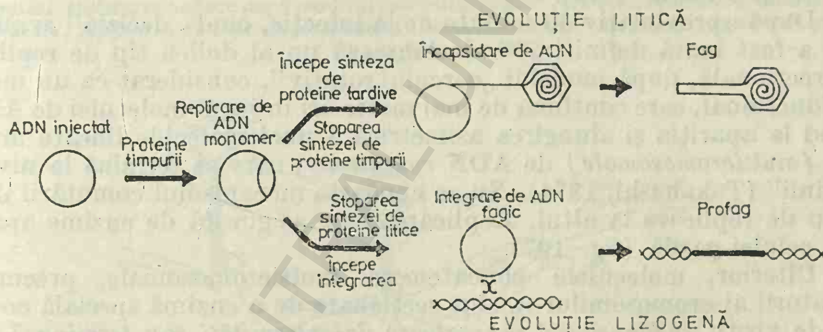


Fig. 106. — Căile de dezvoltare ale fagului temperat. După o fază timpurie comună ambelor căi, virusul poate urma calea infecţiei productive, litice sau a celei lizogene, în care sinteza proteinelor litice este blocată şi genomul fagic se integrează în cromosomul bacterian printr-un proces specific de recombinare (după Echols, 1979).

Fagii temperaţi lizogenizează obişnuit numai o parte din bacteriile sensibile pe care le infectează, în timp ce celelalte sînt lizate ca şi cum fagul ar fi virulent. De aceea, ei produc plaje cu un aspect uşor opalescent, datorită multiplicării bacteriilor lizogene. Echilibrul între lizogenie şi liză poate varia de la 0 la 100%, fiind decis printr-un mecanism reglator foarte complex şi subtil (Hayes, 1980), influenţat de structura genetică a fagului, a bacteriei-gazdă şi de factorii de mediu.

Odată instalată, starea de lizogenie este foarte stabilă şi perpetuată de la o generaţie bacteriană la alta, deoarece profagul rămîne integrat stabil şi represat ca manifestare. Cu toate acestea, în unele cazuri „spontan", dar mai ales sub influenţa unor agenţi care interferă cu replicarea genomului gazdei, profagul poate trece din starea integrată în stare autonomă,

ceea ce declanşează o infecţie litică urmată de distrugerea celulei bacteriene.

Ca urmare, virusul „supravieţuieşte" prin propagare verticală într-o linie celulară-gazdă lizogenă şi prin transmitere orizontală după liză a particulelor infecţioase de la o celulă la alta.

Replicarea fagului λ şi evoluţia litică implică transcrierea genelor pentru sinteza capului, a cozii, a proteinelor de liză, morfogeneză şi replicarea genomului fagic. Are unele aspecte particulare în raport cu replicarea fagului T-par.

La scurt timp după infecţie, genomul λ se circularizează datorită faptului că în celula bacteriană extremităţile adezive „se găsesc" una pe alta şi se leagă formînd o moleculă circulară. În felul acesta, forma lineară a genomului prezentă în particula fagică apare ca o adaptare pentru trecerea prin coada fagului şi injectarea în celula bacteriană, iar forma circulară ca un intermediar pentru replicare.

În prima fază a infecţiei, replicarea genomului λ se face după modelul „cercului simplu", începînd dintr-un punct fix „originea", specifica de proteinele fagice „O" şi „P" şi implicînd creşterea simetrică, bidirecţională, a moleculei ADN pentru a produce două molecule complete, pentru ca apoi procesul să fie repetat, în mod similar, pentru fiecare din ele (Schnos şi Inman, 1970).

După aproximativ 30 minute de la infecţie, cînd „decizia" evoluţiei litice a fost luată definitiv, se declanşează un al doilea tip de replicare unidirecţională, după modelul „cercului rotativ", considerat ca un monomer funcţional, care continuă de mai multe ori în jurul moleculei de ADN, ducînd la apariţia şi alungirea asimetrică a unei molecule lineare multimere *(multicromosomale)* de ADN *concatemer*, care se termină la nivelul „originii" (Takahashi, 1974). Nu se cunoaşte mecanismul comutării de la un tip de replicare la altul. Replicarea este asigurată de enzime aparţinînd celulei-gazdă (fig. 107).

Ulterior, moleculele concatemere multicromosomale, precursori obligatorii ai cromosomilor λ, sînt secţionate de o enzimă specială codificată de virus, *endonuclează generatoare de extremităţi* sau *terminază*, care acţionează la nivelul unor situsuri „cos", separate pe fiecare catenă la o distanţă de 12 nucleotide, în raport cu regiunile corespunzătoare capetelor „mature" (m şi m') ale genomului, determinînd apariţia extremităţilor adezive*) complementare.

Secţionarea este corelată cu morfogeneza fagului: genomul este încorporat în capetele de fag „goale" preformate şi este secţionat de endonuclează atunci cînd o lungime completă a pătruns în interiorul acestora (Kaiser, 1975).

După 60 minute de la infecţie, bacteria-gazdă „explodează" şi eliberează ~ 100 de particule virale care reiau ciclul, infectînd alte celule bacteriene (fig. 108).

---

*) Ca şi fagul λ, fagii T4 şi Φ X 174 se replică tot prin intermediul unor molecule concatemere, dar la fagul T4, ADN intermediar este secţionat la întîmplare în porţiuni de ADN „headful", făcînd ca ADN T4 să fie permutat circular, în timp ce la ADN λ secţiunile se fac la nivelul unor situsuri specifice, care nu coincid pe cele două catene, ci sînt la o distanţă de 12 nucleotide, explicînd formarea extremităţilor m.c. coezive.

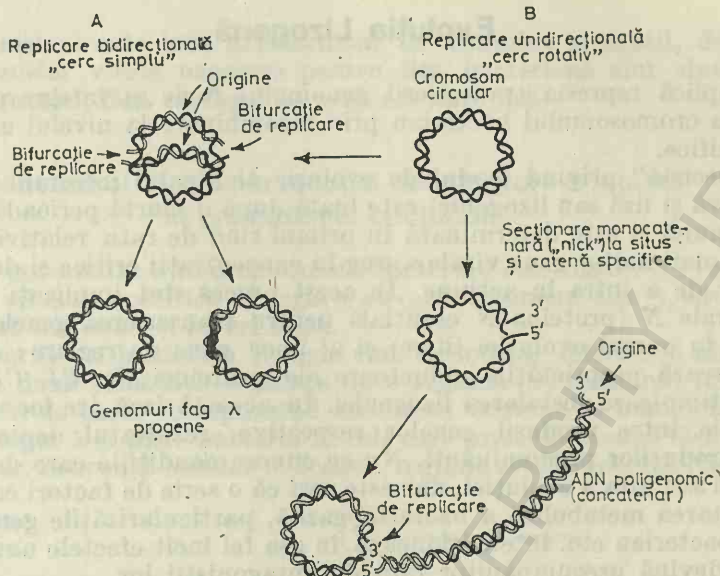


Fig. 107. — Mecanismul replicării ADN al fagului λ în cursul infecţiei productive (litice)) A. Iniţial, replicarea se face după modelul „cercului simplu" (creştere simetrică, bidirecţională. B. Tardiv, replicarea se face după modelul „cercului rotativ" (creştere asimetrică, continuă) (după Watson, 1977).

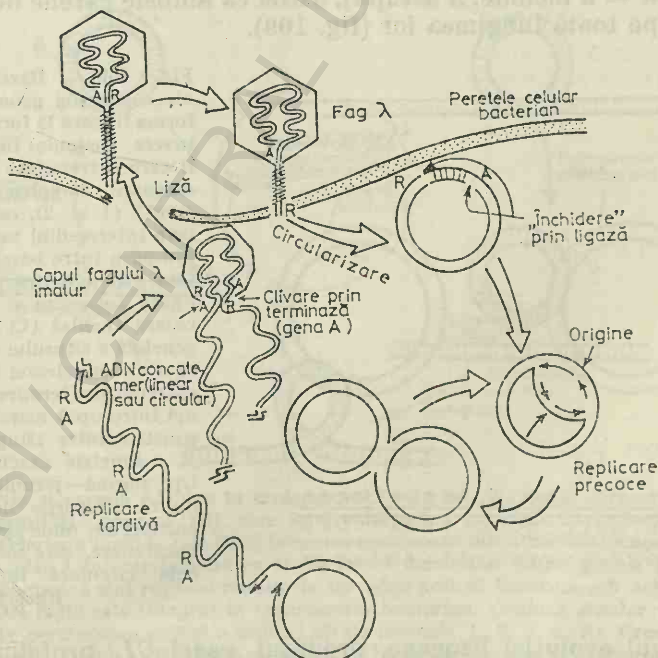


Fig. 108. — Replicarea fagului λ — reprezentare schematică. Genele cuprinse între A şi R sint necesare pentru dezvoltarea vegetativă a fagului (după Enquist şi Skalka, 1978).

Evoluţia Lizogenă

Implică represia transcrierii genomului fagic şi integrarea lui în structura cromosomului bacterian prin recombinare la nivelul unor situsuri specifice.

„Decizia" privind modul de evoluţie al fagului infectant (infecţie productivă şi liză sau lizogenie) este luată după o scurtă perioadă de evoluţie comună şi este determinată în primul rînd de rata relativă cu care produşii mai multor gene virale ajung în concentraţii critice şi de capacitatea lor de a intra în acţiune. În acest proces sînt implicaţi produşii genei virale *N* (proteina N esenţială pentru transcrierea genelor fagice timpurii în cursul evoluţiei litice) şi ai unor gene de reglare: *cro* (care contracarează proprietăţile inductoare ale proteinei N), *CI*, *CII*, *CIII* — care stimulează instalarea lizogeniei. În această fază are loc un fel de competiţie între produşii genelor respective, rezultatul depinzînd de natura produşilor predominanţi. Nu se cunosc condiţiile care determină o direcţie sau alta a evoluţiei, dar este cert că o serie de factori ca temperatura, starea metabolică a bacteriei-gazdă, particularităţile genotipului fagic şi bacterian etc. interacţionează în aşa fel încît efectele unui set de gene să devină precumpănitor faţă de antagoniştii lor.

La scurt timp după infecţia celulei bacteriene, ADN viral d.c. linear trece în forma sa circulară datorită legării covalente a extremităţilor „adezive". Cele două breşe existente la extremităţile fiecărei catene sînt „închise" de o enzimă bacteriană, polinucleotidligaza sau „sealaza" (engl. *to seal* = a închide, a astupa), astfel că ambele catene devin închise (continue) pe toată lungimea lor (fig. 109).

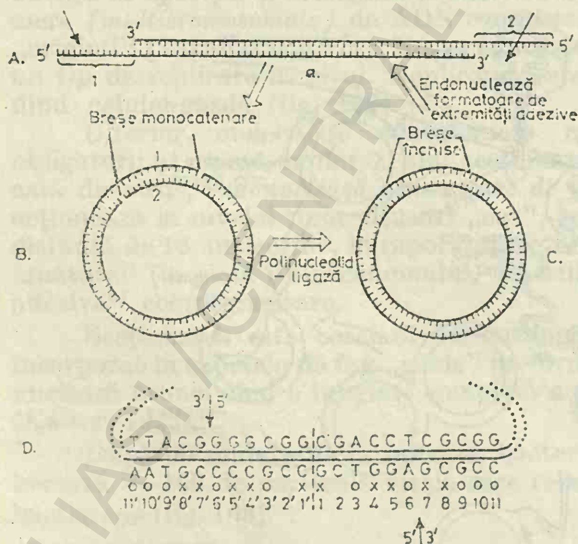


Fig. 109. — Bazele moleculare ale conversiei genomului λ de la forma lineară la forma circulară şi invers. Genomul linear (A) are la fiecare extremitate regiuni monocatenare complementare („adezive") (1 şi 2), care se reunesc prin intermediul unor legături de hidrogen între bazele complementare (B). Ulterior, polinucleotidligaza formează o moleculă circulară închisă (C). D. Structura genetică a situsului de recunoaştere a endonucleazei formatoare de extremităţi (terminaza — *ter*). Linia întreruptă marchează axul de simetrie între stînga şi dreapta. X = simetrie exactă; O = simetrie purină—pirimidină. Săgeţile indică situsurile de acţiune ale enzimei *ter*, unde apar breşele monocatenare, care convertesc molecula circulară într-o moleculă lineară.

În cazul evoluţiei lizogene, produsul genei *CI*, proteina represor, se leagă de cele două gene operator, situate la stînga O_L şi la dreapta O_R genei *CI*, împiedicînd transcrierea celorlalte gene.

Mecanismul este însă extraordinar de complex şi subtil, deoarece produşii genelor virale necesare pentru liza bacteriană sînt sintetizaţi anterior represiei, fără ca fagul să evolueze spre liză.

Genetica şi biochimia reacţiei de integrare a fagului în cromosomul bacterian

Integrarea genomului λ în cromosomul bacterian este rezultatul recombinării între situsuri specifice de legare, *att* („attachement site"), situate pe cromosomul bacterian şi pe cel fagic.

Situsurile *att* bacterian şi fagic sînt structural diferite şi alcătuite fiecare din două jumătăţi, separate de o regiune *O*, mediană, lungă de ~15 perechi de baze, corespunzînd unei zone comune de omologie genetică între fagul λ şi între bacteria *E. coli* care prezintă o zonă identică de crossingover. Secvenţa bazelor în această regiune este cunoscută (fig. 110).

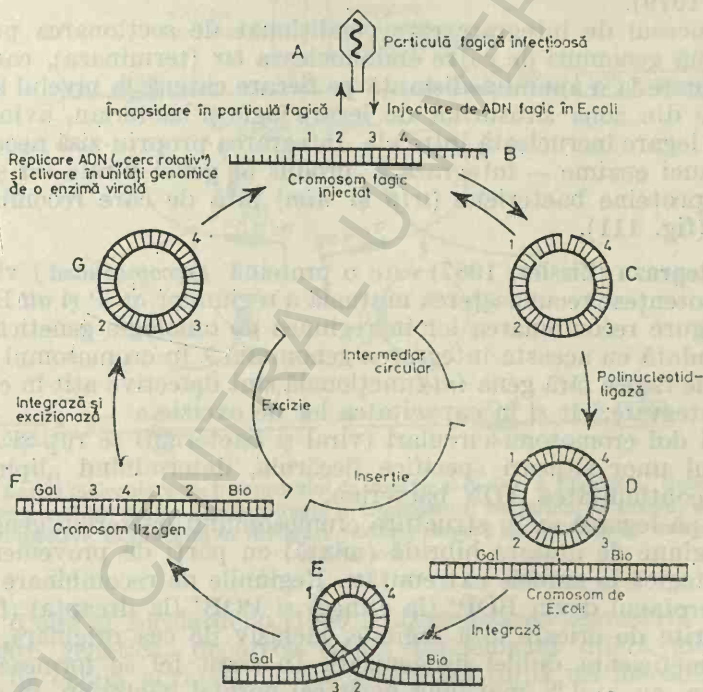


Fig. 110. — Inserţia şi excizia ADN λ în cromosomul bacterian. A. Fagul λ injectează ADN d.c. linear cu extremităţi „adezive" (B), care se circularizează în celula bacteriană (C). Polinucleotidligaza bacteriană închide cele două breşe monocatenare din structura genomului λ(D). Intermediarul circular λ interacţionează cu cromosomul bacterian între genele *gal* şi *bio*. Genomul viral şi bacterian sînt rupte şi reunite la un situs unic al fiecăruia sub acţiunea integrazei virale: ADN fagic este integrat în cromosomul bacterian. Ordinea genelor virale este: 3, 4, 1,2, respectiv permutarea ciclică a ordinei virale normale 1, 2, 3, 4 (E). Cromosomul *E. coli* este lizogen pentru fagul λ (F). În cazul inducţiei litice excizionaza şi integraza virală asigură excizia ADN λ şi conversia lui circulară cu revenire la ordinea originară a genelor (G). Replicarea genomului λ şi clivarea lui specifică de o enzimă virală asigură formarea de extremităţi adezive înainte de împachetarea în alte capside fagice (după Campbell, 1976).

Situsul de legare *att* pe cromosomul fagic *(episitus)* corespunde unei secvenţe de 317 baze şi este notat convenţional POP' (P de la *phage*) în care *O* reprezintă zona de omologie genetică cu situsul respectiv de pe cromosomul bacterian. În mod similar, situsul de legare bacterian *(cromositus)* este alcătuit dintr-o secvenţă de 250 baze şi este notat BOB' (*B* de la bacterie) şi în care *O* are aceeaşi semnificaţie ca la fag. El este mărginit pe harta genetică la stînga de grupul de gene *gal* (E, T, K) ai căror produşi determină capacitatea de folosire a galactozei, iar de partea cealaltă de operonul *bio* (care asigură sinteza biotinei).

Integrarea fagului în cromosom implică recunoaşterea situsurilor specifice de legare (omologie genetică) ale cromosomului bacterian şi fagic urmată de recombinarea lor. Întrucît s-a demonstrat că lungimea de 15 perechi de baze corespunzînd regiunii *O* a situsurilor *att* nu este suficientă pentru o integrare eficientă, este probabil că unele segmente mult mai lungi, neomologe, care le flanchează pe cele omologe ar avea un rol adiţional-cheie în interacţiunea dintre genomul fagic şi cel bacterian (Arber, 1979).

Procesul de integrare este condiţionat de secţionarea prealabilă a celor două genomuri de către endonucleaza *ter* (terminaza), care produce breşe situate la o anumită distanţă pe fiecare catenă la nivelul secvenţelor simetrice din zona situsurilor de legare fagic şi bacterian, avînd posibilitatea de legare încrucişată între ele. Integrarea propriu-zisă necesită intervenţia unei enzime — integraza — produs al genei virale *int* şi probabil a două proteine bacteriene (*trip* şi *him*) fără de care recombinarea nu are loc (fig. 111).

Integraza (Zissler, 1967) este o proteină *(recombinază)* virală capabilă să potenţeze recunoaşterea mutuală a regiunilor *att* P şi *att* B disparate şi să asigure recombinarea lor în regiunea de omologie genetică *O*, determinînd odată cu aceasta integrarea genomului λ în cromosomul bacterian. Mutantele fagice fără gena *int* funcţională sînt defective atît în capacitatea lor de integrare, cît şi în capacitatea lor de excizie.

Cei doi cromosomi circulari (viral şi bacterian) se rup şi se reunesc la nivelul unor situsuri specifice fiecăruia, determinînd „lipirea" ADN viral în continuitatea ADN bacterian.

După legarea sa în structura cromosomului bacterian genomul fagic are o regiune de ataşare hibridă (mixtă) cu părţi de provenienţă bacteriană şi fagică la ambele extremităţi. Regiunile de recombinare care flanchează profagul devin BOP' (la stînga) şi POB' (la dreapta) (fig. 111) şi sînt diferite de oricare altă regiune, inclusiv de cea originară, fapt care explică ineficienţa dublei lizogenizări. În acest fel se formează un nou cromosom, cu $\sim 1\%$ mai lung decît cel normal bacterian, în care genomul fagului temperat a devenit un *profag (provirus)* ce face parte integrantă din cromosomul bacterian cu care se replică pasiv, sincron la fiecare ciclu de diviziune bacteriană, asemenea unor gene cromosomale.

Celula bacteriană supravieţuieşte integrării profagului pentru că a devenit lizogenă, stare în care funcţionarea genelor specifice virale de replicare autonomă fiind suprimată.

Ordinea genelor în cromosomul fagic inserat ca profag este diferită de secvenţa lineară a fagului vegetativ, deoarece în cursul integrării geno-

mul fagic este secţionat pe calea unor breşe decalate, situate la nivelul situsurilor de legare *(att)* şi nu pe calea unor breşe în regiunea care ar produce extremităţile adezive ale fagului λ vegetativ. Ca urmare, ordinea uneia dintre secvenţele de gene respective reprezintă permutarea circulară a

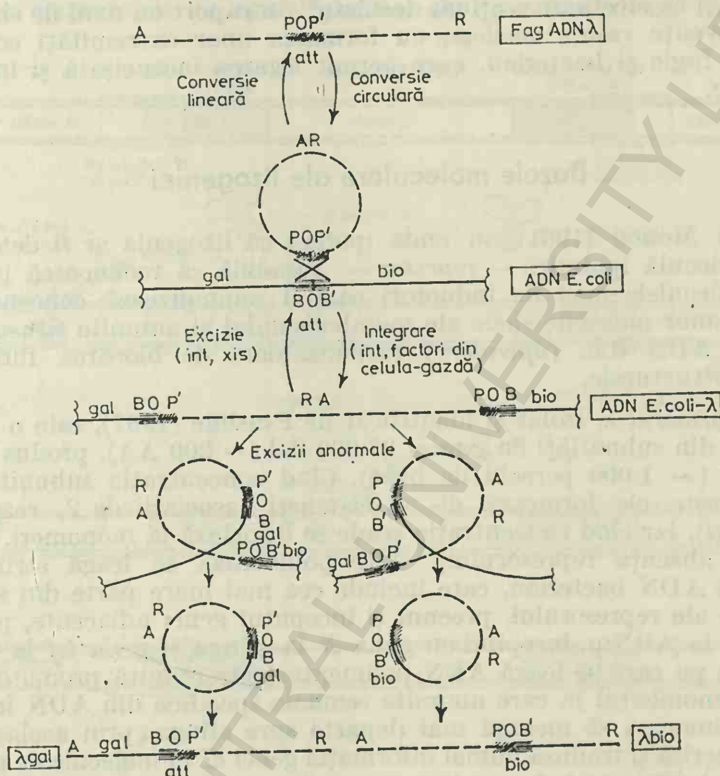


Fig. 111. — Bazele moleculare ale fenomenului de inserţie şi incizie a fagului λ. Schema prezintă detalii asupra reacţiilor dintre genomul fagic şi cromosomul bacterian, la nivelul situsurilor de legare *(att)* respective, în procesul de integrare, excizie corectă sau eronată şi enzimele care le realizează.

celeilalte (Calef şi Licciardello, 1960). Lizogenizarea reprezintă un tip de recombinare genetică, deoarece celula lizogenizată diferă genotipic şi fenotipic de celula normală. Ea se realizează după un mecanism diferit de recombinarea generală (legitimă sau omologă), deoarece integrarea fagului se realizează cu aceeaşi rată la bacteriile care prezintă mutaţii la nivelul genelor *rec* (pentru recombinare generală la bacterii) şi *red* (pentru recombinare generală la fag). Dealtfel, gradul de omologie relativă şi extinderea situsurilor de legare *att* sînt insuficiente pentru a permite un proces de recombinare generală. În plus, în timp ce în recombinarea legitimă produsul rezultat după recombinare este la fel de lung ca şi cele originare, în procesul de recombinare din lizogenie produsul iniţial (originar) şi cel care rezultă din excizie sînt mai scurte decît cel rezultat din recombinare.

Recombinarea care însoţeşte integrarea fagului λ corespunde unui proces unic, numit de *recombinare integrativă* (Shapiro, 1977) sau *recombinare la situsuri specifice*. Deoarece în aceste cazuri omologia între situsuri nu este perfectă ca în recombinarea generală, la baza acestui proces stă activitatea unor enzime capabile să recunoască anumite situsuri (secvenţe) specifice şi să efectueze secţiuni decalate*) în raport cu axul de simetrie al unor secvenţe *relativ omologe*, cu formarea unor extremităţi coezive în genomul fagic şi bacterian, care permit legarea încrucişată şi integrarea ca profag.

Bazele moleculare ale lizogeniei

Jacob şi Monod (1961) au emis ipoteza că lizogenia ar fi determinată de o moleculă ipotetică — *represor* — capabilă să recunoască în acelaşi timp moleculele mici de inductori care îi semnalizează concentraţia în celulă a unor molecule-cheie ale metabolismului şi anumite situsuri specifice din ADN d.h. *(operatori)* răspunzătoare de blocarea funcţionării genelor structurale.

Represorul λ, izolat şi identificat de Ptashne (1967), este o proteină compusă din subunităţi cu g.m. ~ 27 000 dal (~ 200 AA), produs al genei virale *cI* (~ 1 000 perechi de baze). Cînd concentraţia subunităţilor în mediu creşte, ele formează di- şi tetrameri (asociaţii de 2, respectiv 4 subunităţi), iar cînd concentraţia scade se disociază la monomeri.

În absenţa represorului, ARN-polimeraza se leagă strîns de o regiune a ADN bacterian, care include cea mai mare parte din situsurile de legare ale represorului, precum şi începutul genei adiacente, pe care o transcrie la ARNm, începînd cu gena *N* la stînga şi gena *tof* la dreapta. Regiunea pe care se leagă ARN-polimeraza este numită promotor.

În momentul în care anumite semnale specifice din ADN împiedică ARN-polimeraza să meargă mai departe spre stînga, prin acelaşi proces este transcrisă şi tradusă numai informaţia genei *cI* în molecule de proteine-represor. Acestea, sub forma lor mono-, di- sau chiar tetrameră migrează spre situsurile de legare din cele două regiuni operator ale ADN λ, blocînd accesul ARN-polimerazei la regiunile promotor ale genelor *N* şi *tof* (fig. 112).

ARN-polimeraza este de ~ 20 ori mai grea decît represorul şi deci de cîteva ori mai mare ca volum. Ea este în competiţie cu represorul pentru situsul de legare al operonilor. În bacteriile lizogene represorul este prezent în 10 — 20 de copii, cele mai multe fiind aşezate adiacent unele lîngă altele, acoperind, fiecare, cîte 30 — 100 de baze din structura celor două regiuni specifice operator. Cele două regiuni operator, care reprezintă situsul de acţiune al represorilor, conţin fiecare ~ 75 perechi de baze şi sînt situate la stînga (O_L), respectiv la dreapta (O_R) genei *cI*. Fiecare operator are, la rîndul său, trei regiuni specifice cu rol de situs de recunoaştere şi legare a represorului (notate O_L1, O_L2, O_L3, respectiv O_R1, O_R2 şi O_R3.

---

*) În recombinarea legitimă nu pot exista secţionări decalate ale moleculei de ADN, deoarece enzimele de restricţie care recunosc şi secţionează la nivelul mai multor situsuri ar determina o modificare brutală a aranjării originare a genelor.

Situsurile de legare sînt alcătuite din ~ 17 perechi de baze cu secvențe similare, avînd un grad foarte mare de simetrie internă rotațională de tip 2, în jurul perechii centrale de baze (secvențe inversate imperfecte sau palindroame imperfecte). Fiecare situs poate lega un dimer de represor, blocînd transcrierea genelor adiacente necesare pentru inițierea infecției litice. Suprafețele de legare specifice ale operatorului sînt separate de

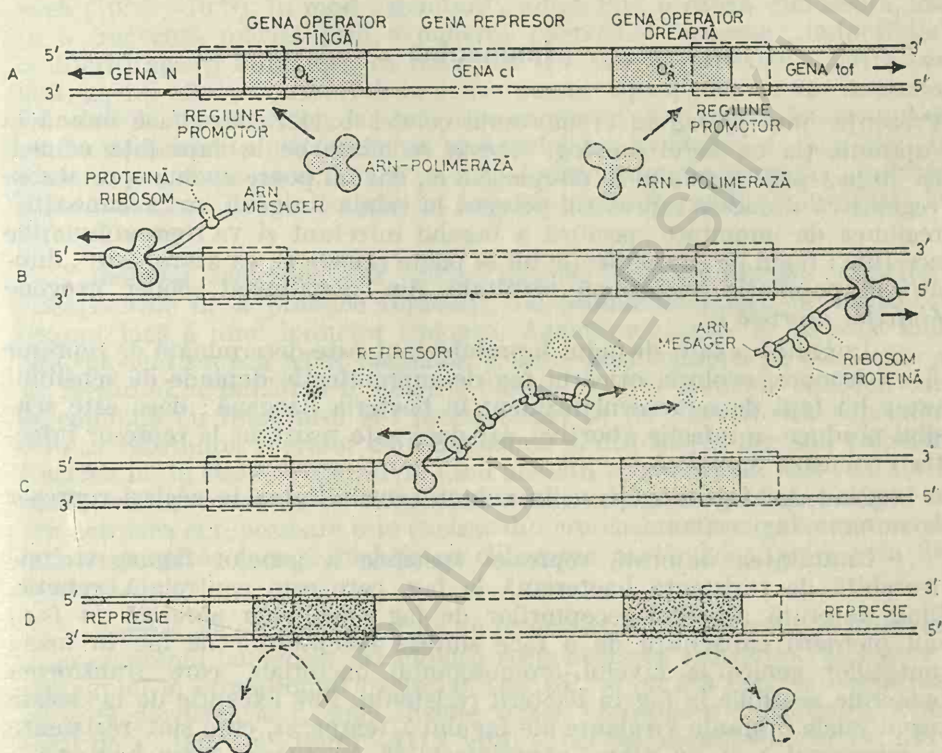


Fig. 112. — Exprimarea și represia fagului λ în bacteria *E. coli*. Transcrierea normală a ADN la ARNm este efectuată de ARN-polimerază, care după fixare în regiunea promotor sintetizează ARNm în direcția 5'→ 3', copiind catena ARN cu polaritate opusă. Ea circulă în direcții opuse, copiind catene diferite ale ADN, începînd cu gena *N*(stînga) și gena *tof* (dreapta), de la nivelul regiunilor operator. Traducerea ARNm la proteine asigură replicarea fagului și liza (A, B). În cazul represiei, prin același proces este transcrisă și tradusă în molecule *represor* numai gena *cI*. Semnalele stop specifice împiedică transcrierea genelor în continuare. Moleculele de represor ca monomere sau, mai probabil, ca dimere sau tetramere se leagă de regiunile operator ale ADN λ, blocînd accesul ARN-polimerazei la regiunile promotor ale genelor *N* și *tof* (C, D) (după Campbell, 1976).

regiuni intermediare ale ADN (bogate în A — T) care, de asemenea, sînt acoperite și protejate de dimerii de represor.

Moleculele de represor se leagă exclusiv de ADN d.c., stabilizînd secțiunea din ADN de care s-au legat și împiedicînd desrăsucirea moleculei premergătoare transcrierii la ARNm. Ca urmare, în prezența lor, bacteria lizogenă nu mai fabrică nici un tip de ARNm specific, cu excepția genei *cI* care codifică represorul însuși.

Rolul esențial al represorului λ este demonstrat de mutațiile fagice (tip *cI 851*) care duc la sinteza unui represor termolabil, activ la 30 — 37°C și inactivat la 42°C, spre deosebire de represorul de tip sălbatic activ la ambele temperaturi. Bacteriile infectate cu acești fagi evoluează lizogen la 37°C. Prin expunere la 42°C starea de lizogenie încetează, fiind înlocuită de inducția litică.

Imunitatea

Prezența unui profag în cromosomul celulei bacteriene o face imună la suprainfecția cu fagul omolog. Acesta se adsoarbe la suprafața celulei, își „injectează" genomul în citoplasma ei, dar nu poate evolua spre starea vegetativă deoarece represorul prezent în celula lizogenă va „recunoaște" regiunea de imunitate specifică a fagului infectant și va represa funcțiile acestuia : fagul de suprainfecție nu se poate replica și, ca atare, este „diluat" în populația bacteriană rezultată din diviziunea celulei lizogene *(infecție abortivă)*.

Imunitatea față de fagul suprainfectant este determinată de represor și, ca urmare, evoluția oricărui fag de suprainfecție depinde de sensibilitatea lui față de represorul rezident în bacteria lizogenă : dacă este sensibil produce o infecție abortivă, iar dacă este rezistent la represor infecția evoluează spre liză.

Cînd doi fagi diferiți au în comun sensibilitatea la același represor se numesc fagi *coimuni*.

Imunitatea datorată represiei specifice a genelor fagice trebuie deosebită de rezistența bacteriană la fag, care este controlată genetic, fiind datorată absenței receptorilor de fag *(rezistența naturală la fag)* sau pierderii capacității de a face sinteza receptorilor de fag în urma mutațiilor genice la nivelul cromosomului bacterian, care transformă bacteriile sensibile la fag în bacterii rezistente. Fac excepție de la aceste reguli unele mutante virulente ale fagului λ temperat, care sînt rezistente la represorul λ și, ca atare, suprainfectează cu succes orice bacterie λ lizogenă.

Suprainfecția bacteriilor lizogene

Deși în mod normal un fag de suprainfecție poate infecta numai dacă regiunea sa de imunitate din genom este diferită de cea a fagului lizogen (λ), în mod excepțional, cînd bacteriile au mai mult de un situs *att* pentru același profag pot fi ocupate toate situsurile simultan. De asemenea, tot excepțional, suprainfecția poate rezulta prin integrarea a doi profagi în același situs, inserați fie unul într-altul, fie în tandem (adiacent unul față de altul). În plus, cromosomul bacterian poate conține situsuri de atașare pentru mai mulți fagi diferiți (neînrudiți), care pot fi ocupate în același timp.

Inducția litică

Din timp în timp, unele bacterii lizogene, care perpetuează din generație n generație capacitatea potențială de a produce fag litic în absența unei infecții exogene, produc fag matur, ca rezultat al trecerii profagului în starea de fag vegetativ. Acest fenomen se poate produce cu o frecvență mică (10^{-2} —10^{-7}), în mod „spontan", adică fără o cauză cunoscută, sau cu o frecvență mărită prin expunerea bacteriilor lizogene „inductibile" la diferiți agenți inductori, ca radiațiile UV sau X, peroxizii, iperita azotată, agenți alkilanți etc. Sub acțiunea acestor agenți, un număr însemnat de celule bacteriene mor, iar cele care supraviețuiesc suferă fenomenul de „inducție", tradus prin trecerea profagului lor în starea de fag litic. În felul acesta, după aproximativ o oră, fiecare bacterie lizogenă „indusă" eliberează circa 100 de corpusculi fagici maturi. Mecanismul inducției nu este cunoscut.

Inducția spontană s-ar putea datora fie unei represii deficitare (incapacitate de a produce represor), fie producerii printr-un mecanism ignorat încă a unui inductor endogen. Agenții mutageni ar acționa indirect, blocînd sinteza ADN bacterian și favorizînd inducția pe două căi : a) fie facilitînd acumularea în celulele blocate a unui inductor endogen care se combină cu represorul și-l inactivează ; b) fie blocînd sau suprimînd sinteza substanței represor care împiedică multiplicarea fagului, respectiv trecerea lui în starea vegetativă. Cînd această substanță nu mai este sintetizată, concentrația sa în citoplasmă scade, astfel că profagul scăpat de sub acțiunea ei represoare este excizat din cromosomul bacterian și trece în faza vegetativă, care se încheie cu eliberarea particulelor fagice prin liza celulară.

Excizia genomului fagic este un proces exact invers celui de integrare în cromosomul bacterian. El implică recunoașterea situsurilor de legare a profagului în cromosomul bacterian (*att* BP′ și *att* PB′) într-o reacție care necesită participarea a două enzime virale, *excizionaza* și *integraza*, avînd rolul de a „tăia" și „reuni" ADN viral și cel bacterian (Guarneros, 1974, 1976). Profagul rămîne inserat în cromosomul bacterian atît timp cît transcrierea genei *Xis* care codifică excizionaza este blocată de represorul λ. Cînd represia încetează, gena devine funcțională și bacteria sintetizează enzima. După excizie, profagul trece în stare autonomă, de genom circular vegetativ, care se replică sub controlul propriilor sale funcții, lizînd celula, cu formare de fagi progeni.

În mod normal, excizia este precisă : ADN viral este secționat exact la nivelul la care s-a integrat (*att P* și *att B*), în așa fel încît fagii eliberați prin inducția bacteriei lizogene sînt identici cu virusul infectant originar.

Cu o frecvență mică însă (10^{-5} — 10^{-6}), excizia se face anormal : ruperea și reunirea celor două genomuri se face în alte regiuni, de-a lungul cromosomului bacterian. Rezultă o moleculă de ADN circulară care conține o parte din ADN bacterian, adiacentă locului de inserție al profagului (în cazul fagului λ genele *gal* sau *bio*) și din care lipsește o porțiune echivalentă din ADN fagic, situată la capătul opus al profagului. În acest caz, dacă mărimea și particularitățile fizice ale moleculei sînt corespunzătoare, în cursul procesului de morfogeneză virală aceste molecule hibride vor fi

înglobate în unele particule virale, în al căror genom o parte din ADN viral este înlocuit cu ADN bacterian.

În felul acesta se formează *fagii transductori* — produși prin erori de excizie ale profagului din cromosomul bacteriilor lizogene. Cînd acești fagi infectează o nouă celulă bacteriană, îi transmit și genele bacteriene pe care le poartă în structura lor. Spre exemplu, dacă un fag transductor gal^+ (care poartă genele pentru utilizarea galactozei) infectează o bacterie sensibilă gal^- o transformă într-o bacterie gal^+ Procesul este denumit *transducție genetică specializată*.

Inducția zigotică. Inducția profagului mai poate avea loc prin conjugarea între o celulă-donor Hfr lizogenă (cu profag) și o celulă receptor nelizogenă. Cînd segmentul cromosomal cu profagul inserat pătrunde într-o citoplasmă fără represor începe trancrierea operonilor O_L și O_R ai fagului și, ca urmare, inducția litică.

Semnificația biologică generală a lizogeniei

Existența unor mecanisme complexe și specifice de integrare și excizie a ADN fagic în cromosomul bacterian poate juca un rol important în „supraviețuirea" virusului în natură. Deși se știe foarte puțin despre forțele care acționează asupra virusurilor în natură, se presupune că integrarea lor în cromosom imediat după infecție, persistența în bacteriile lizogene, în stare integrată stabil, și excizia în anumite condiții specifice ar fi în avantajul lor. Deoarece integrarea și excizia au exigențe enzimatice diferite virusul poate controla direcția și gradul acestor activități prin reglarea sintezei și/sau activității *integrazei* și *excizionazei* (Campbell, 1976).

Posibilitatea de a „lipi" segmente de ADN viral în continuitatea unui genom preexistent poate reprezenta un mecanism important prin care cromosomii au devenit în cursul evoluției mai mari și mai complecși. Astfel, procesul poate avea importanță atît în evoluție, cît și în dezvoltare. Această proprietate poate fi folosită în practică în tehnicile de inginerie genetică, utilizînd fagul λ ca vector pentru clonarea și amplificarea unor secvențe de ADN la virusuri, procariote și chiar la eucariote, după ce unele regiuni neesențiale din genomul fagic au fost înlocuite cu fragmente de ADN străine, cu lungime echivalentă.

Fagii cu genom ARN

(Pl. 35)

Fagii ARN cei mai studiați (f2, MS2, R17, Qβ etc.) parazitează *E. coli* și sînt cunoscuți mai ales sub denumirea de *fagi ARN masculi*, deoarece, infectează numai bacteriile cu caracter ♂ (care poartă o plasmidă de sex), datorită capacității lor de a se fixa numai pe suprafața pililor de sex. Sînt dintre cele mai mici virusuri cunoscute.

Structură. Fagii ARN au forma unor poliedre regulate datorită simetriei lor icozaedrice, un ∅ de 20 – 27 nm şi o g.m. de 3,5.10^{6} dal (77S) pentru fagii f2, R17, respectiv 4,2.10^{6} dal pentru fagul Qβ (85S).

Capsida fagului f2 este alcătuită din 180 de subunităţi identice de proteine capsidale (g.m. 14 700 dal, ~129 AA a căror secvenţă este cunoscută) grupate în 32 de capsomere (12 pentoni şi 20 hexoni). În plus, fiecare virion conţine o singură moleculă de *proteină A* (engl. *attachement*) sau *proteina de maturare* necesară pentru asamblarea corectă şi pentru integritatea funcţională a virionului, asigurînd fixarea fagului de bacterie şi pătrunderea în celulă a ARN viral.

Genomul viral reprezintă 30% din greutatea virionului şi este format dintr-o moleculă de ARN m.c. alcătuită din ~ 3 300 – 4 500 nucleotide (avînd o lungime de 1,06 μm şi g.m. 1.10^{6} dal) a căror secvenţă a fost complet determinată la fagul MS2 (Fiers, 1976). Pentru a putea fi „împachetat" în capsida foarte mică, genomul viral are o structură tridimensională compactă, realizată relativ uşor, deoarece ~ 70% din nucleotidele componente sînt „împerecheate" între ele, formînd regiuni dublu catenare mai mult sau mai puţin perfecte, datorită cărora zonele lineare m.c. alternează cu zone în formă de bucle sau de „ac de păr" (modelul de structură cu aspect de „floare") (fig. 113). Genomul fagilor R17 şi MS2 este alcătuit din trei gene aşezate în ordinea *proteină A*, *proteină capsidală*, *replicază*, aprox. 300 de nucleotide, fiind fără rol în codificarea genetică. Genomul are polaritatea « + » şi, ca urmare, este infecţios şi funcţionează ca ARNm imediat după pătrunderea sa în celulă.

Replicarea fagilor ARN. Adsorbţia fagilor ARN♂ controlată de proteina A se face numai la nivelul receptorilor de fag situaţi pe pilii de sex. Bacteriile „rase" de pili îşi pierd sensibilitatea la fag, pentru a o recăpăta cînd pilii s-au format din nou. Injectarea genomului s-ar face prin canalul central al pilului, deşi nu există probe indiscutabile în favoarea acestui mecanism (Edgell şi Ginoza, 1965).

După ce a pătruns în celulă, genomul viral (ARNv) infecţios este polifuncţional: 1) serveşte ca ARNm pentru codificarea celor 3 proteine virale (la fagul Qβ patru proteine virale); 2) este recunoscut specific şi replicat de replicaza indusă de el; 3) formează parte integrantă din particula fagică matură.

Replicarea fagului se realizează prin două procese cuplate, în care ARNv acţionează ca ARNm pentru sinteza de proteine virale şi respectiv serveşte ca model pentru sinteza de ARNv progen, care la rîndul său serveşte fie ca ARNm, fie ca model pentru sinteza de noi molecule de ARNv, după schema:

1. ARN viral « + » (cu rol de ARN mesager) + sistemul celular de traducere a informaţiei genetice $\xrightarrow{\text{traducere}}$ proteine virale.

2. ARN viral (cu rol de matriţă) + replicaza virală $\xrightarrow{\text{replicare}}$ ARN viral progen «+» ↗ (1) traducere ↘ (2) replicare

Sinteza proteinelor virale implică producerea coordonată a celor trei proteine virale, în raport cu exigenţele procesului de replicare a fagu-

lui, care necesită o producere masivă de proteine capsidale (PC) şi un număr mai mic de replicaze şi mai ales de proteină A (PA).

În lipsa posibilităţii de a codifica proteine specifice cu funcţie pură de reglare, datorită dimensiunilor lor foarte mici, fagii ARN dispun de un mecanism foarte sofisticat de reglare a programului de transcriere şi de traducere a ARN care include intervenţia structurii secundare complicate a genomului, ca şi aceea a proteinei capsidale însăşi.

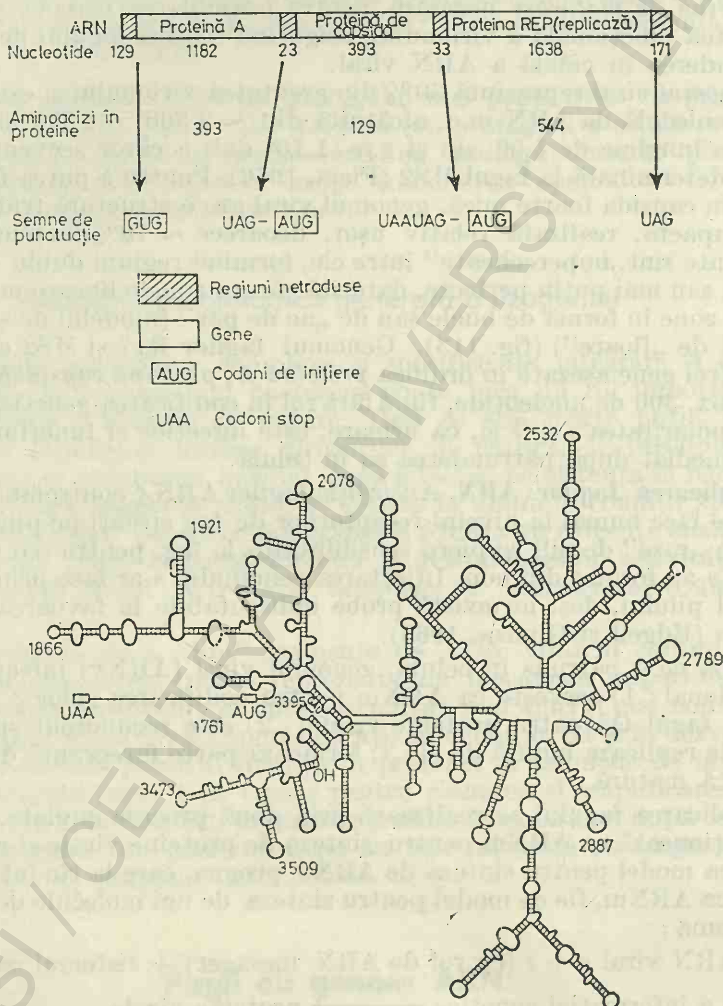


Fig. 113. — Harta genetică a fagului MS2 şi structura moleculară a ARN („modelul în floare"), cu menţionarea poziţiei codonilor *stop* şi *start* şi a numărului de nucleotide în cele trei gene structurale.

Genomul viral acţionează ca un ARNm policistronic, avînd 3 situsuri de legare la ribosomi, cîte unul pentru fiecare cistron. Datorită structurii secundare pronunţate, accesibilitatea diferitelor secvenţe ale ARN pentru

ribosomii şi moleculele din mediu diferă foarte mult. După infecţia celulei-gazdă, singurul situs de legare ribosomal accesibil în structura ARN fagic este situat la începutul genei *pc* care codifică proteina capsidală. În faza iniţială a infecţiei, ribosomii nu se pot lega de gena proteinei A sau a replicazei (*rep*) deoarece situsurile lor de legare sînt blocate de structura secundară a genomului. În momentul în care începe sinteza proteinei PC, datorită modificărilor conformaţionale produse în structura ARN, situsul blocat *rep* devine accesibil ribosomilor, ceea ce permite traducerea genei respective şi formarea de polimerază *(replicază)*. Experimental, s-a demonstrat că numărul proteinelor capsidale este mult mai mare decît al celor de replicază, ca şi cum numai 10% din ribosomii care au tradus gena *pc* au acţionat şi pe gena *rep*. Explicaţia rezidă în faptul că proteinele capsidale (*pc*) au proprietatea de a se lega de situsurile de legare ribosomală la începutul genelor *rep* şi *pa*, inhibînd sinteza proteinelor respective din ce în ce mai puternic. Rezultatul este că gena *pa* este tradusă numai foarte rar de-a lungul ciclului de infecţie, iar gena *rep* este tradusă mai frecvent în faza precoce a ciclului şi numai excepţional în faza tardivă. După 10 minute de la infecţie, în celulă s-au acumulat suficiente molecule *pc* care blochează sinteza de replicază. Reglarea este foarte utilă deoarece în acest moment în celulă s-au acumulat suficiente molecule de *rep*, iar rolul fazelor tardive ale ciclului (*pc*) este de a produce mari cantităţi de proteine virale structurale. În esenţă deci, reglarea sintezei proteinelor virale este controlată prin două mecanisme: a) structura secundară a ARNv şi b) proteina capsidală care se comportă ca un represor specific al traducerii celorlalte gene.

În tot cursul infecţiei fagice, cea mai mare parte din ARNv este asociat cu poliribosomii deoarece atît în faza de replicare, cît şi în cea de maturare, traducerea şi replicarea ARN sînt cuplate.

Replicarea genomului viral necesită un mecanism selectiv eficient capabil să recunoască şi să replice specific ARN fagic, neglijînd cantitatea foarte mare de ARN aparţinînd bacteriei-gazdă. Acest mecanism este realizat prin structura *replicazei* active analizată la fagul Qβ, care este un complex enzimatic tetrameric, format prin asocierea produsului genei virale *rep* (subunitatea β-polipeptid de ~ 580 AA, g.m. 65 000 dal, separat inactiv) cu trei polipeptide (Tu, TS şi S1, respectiv factorii α, β şi γ) ale bacteriei-gazdă (fig. 114).

Factorii Tu şi Ts (cu g.m. ~ 35 000 dal, respectiv ~ 45 000 dal), componenţi ai complexului proteic T descris la *E. coli*, care participă la creşterea lanţului polipeptidic, sînt implicaţi în plasarea moleculelor de AA ~ ARNt pe situsul „A" ribosomal. Ei au dublu rol: sau se asociază cu ribosomii de *E. coli* şi participă la traducerea informaţiei bacteriene sau se asociază cu factorii *rep* şi S1 pentru a forma replicaza Qβ. Factorul S1 mai puţin cunoscut (g.m. 70 000 dal) se leagă ferm de subunitatea ribosomală 30S şi ar fi necesar în etapa de iniţiere a sintezei ARN.

Replicarea ARN viral (ARNv sau « + ») este un proces în două trepte, care se realizează pe calea formării unui intermediar de replicare şi a unei catene complementare „minus" (ARNc sau « — ») în care secvenţa de nucleotide este strict complementară faţă de ARNv (ARN « + »), în aşa fel încît prin transcrierea unei catene „minus" va lua naştere o secvenţă identică cu secvenţa originară „plus" (ARNv) (Hindley, 1973).

Procesul începe prin interacţiunea şi legarea replicazei de situsul său de recunoaştere situat la capătul 3′ al ARNv (catena parentală « + ») şi sinteza consecutivă a unei catene complementare « — » care creşte în direcţia 5′↦ 3′ (fig. 115). Deşi formarea catenei complementare « — »

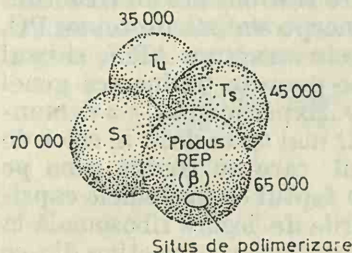


Fig. 114. — Structura moleculară a replicazei Qβ, formată dintr-un polipeptid codificat de genomul viral şi trei componenţi din celula-gazdă (după Watson, 1977).

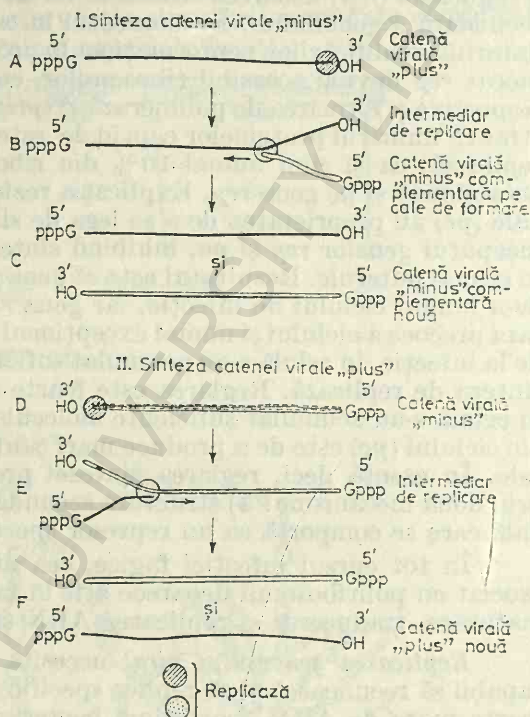


Fig. 115. — Mecanismul molecular al sintezei ARN fagic. Replicaza interacţionează cu situsul său de recunoaştere, situat la capătul 3′ al ARNv (A), sintetizînd o catenă complementară care creşte în direcţia 5′→ 3′(B). C. Catenă complementară « — » integral sintetizată. D—E. Replicaza fără factorii gazdei interacţionează cu catena Qβ « — » şi catalizează sinteza unei noi catene « + », care creşte în direcţia 5′→3′. Se formează o nouă catenă de ARN « + » (F) (după Hindley, 1973).

se face prin împerecheri de baze, în cursul sintezei ARN« — » nu se formează un intermediar de replicare dublu helical. Numai la nivelul situsului de legare al replicazei există o scurtă bandă de ARN dublu helicală în structura intermediarului de replicare, în aşa fel încît se poate spune că replicaza însăşi acţionează pentru a separa catena nou sintetizată « — » de catena matriţă parentală « + ». Produsul primei etape de sinteză este o catenă ARNc « — » liberă.

În continuare, atît catena progenă « — », cît şi catena originară « + » servesc ca matriţe pentru a produce mai multe catene « + » şi « — ». Formarea genomurilor virale progene « + » are loc prin legarea aceleiaşi enzime de capătul 3′ al catenei „minus", care de data aceasta este folosit ca matriţă pentru sinteza unor noi catene « + ».

Sinteza are loc tot în direcţia 5′→3′ şi în condiţii optime, catena de ARN se alungeşte cu 35 de nucleotide pe secundă la 37° C. La sfîrşitul etapei de sinteză se formează o nouă catenă de ARNv « + » (Hindley, 1977), (fig. 116).

Morfogeneza fagului. În momentul în care în celula bacteriană s-au acumulat suficiente proteine capsidale, proteina A şi molecule de ARN « + », începe morfogeneza spontană (autoasamblarea) după schema :

1 moleculă ARNv + 1 moleculă proteină A + 180 molecule proteine capsidale = 1 virion.

Inițial, proteina A se leagă precoce de o moleculă de ARNv « + » pentru a forma un complex compact, convertind-o într-o formă care grăbește agregarea proteinelor capsidale în jurul lor. Pe măsură ce infecția

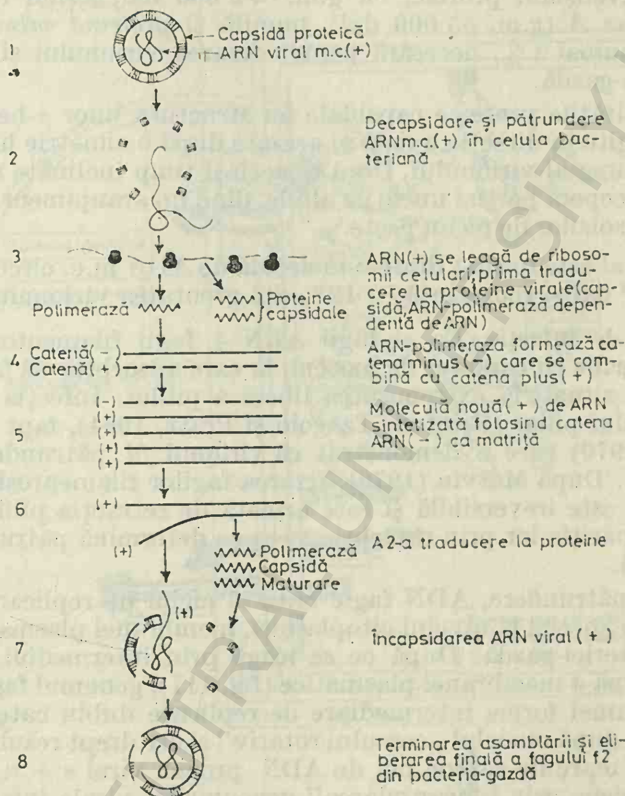


Fig. 116. — Reprezentarea schematică a ciclului de replicare a fagului f2 (după Horne, 1978).

progresează, particulele progene se grupează unele lîngă altele sub forma unor șiruri fine cu aspect cristalin care ocupă o bună parte din celula bacteriană. Cînd bacteria se lizează, după ~ 60 minute de la infecție, se eliberează ~ 40 000 particule fagice mature.

Fagii filamentoși

(Pl. 36)

Fagii filamentoși (f1, fd, M13, Pf1) care infectează *E. coli* au forma unor bastonașe flexibile, cu ∅ de 6 nm și o lungime variabilă după tulpină de 1 000 – 2 000 nm.

Structura lor este aceea a unui cilindru proteic gol, deschis la ambele extremități, corespunzînd capsidei proteice care acoperă un „corp central" reprezentat de genomul fagic.

Capsida este alcătuită din două tipuri de proteine: a) *proteina capsidală* sau de înveliș numită și *proteină majoră* deoarece reprezintă ~ 99% din masa învelișului proteic, cu g.m. ~ 5 000 dal, avînd rol structural și b) *proteina A* (g.m. 55 000 dal), numită și *proteină minoră*, deoarece reprezintă numai 1%, necesară pentru fixarea virionului și pătrunderea lui în celula-gazdă.

Subunitățile proteice capsidale au structura unor α-helice suprarăsucite, alungite în direcție axială și așezate după o simetrie helicală, paralel cu axul lung al virionului, fiind în același timp înclinate radial, în așa fel încît se acoperă parțial unele pe altele, dînd un aranjament de ansamblu asemănător solzilor de pe un pește.

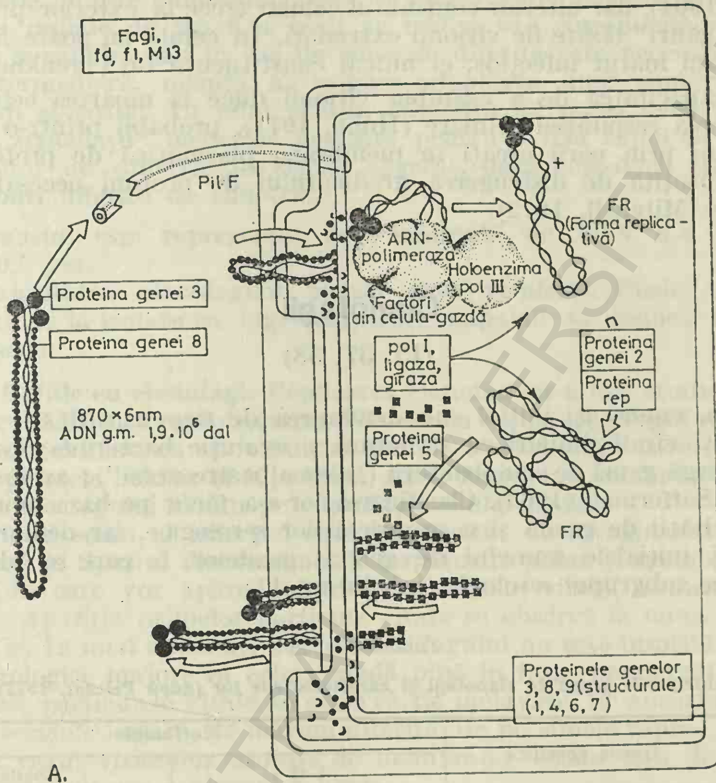
Genomul este format dintr-o moleculă de ADN m.c. circulară închisă, cu g.m.2.10^6 dal și reprezintă ~ 12% din greutatea virionului.

Ciclul de infecție. Ca și fagii ARN ♂, fagii filamentoși infectează numai bacteriile cu caracter de mascul, la care adsorbția se face pe receptori speciali situați la extremitatea liberă a pililor. Infecția s-ar face pe calea canalului piliar (Brinton, Tzagolo și Pratt, 1964), fapt contestat de Trenkner (1970) care a demonstrat că virionul *fd* pătrunde integral în celula-gazdă. După Marvin (1976), fixarea fagilor filamentoși pe extremitatea pililor este ireversibilă și este urmată de retracția pililor în celula-gazdă și dispariția lor prin resorbție, ceea ce determină pătrunderea fagului în celulă.

După pătrundere, ADN fagic inițiază ciclul de replicare, însoțit de modificări în special la nivelul citoplasmei, membranei plasmatice și mezozomilor bacteriei-gazdă. După ce se leagă prin intermediul proteinei A de fața internă a membranei plasmatice (fig. 117), genomul fagic se replică cu ajutorul unei forme intermediare de replicare dublu catenare. Replicarea se face după modelul „cercului rotativ" și are drept rezultat formarea unui număr mare de catene noi de ADN progen viral « + ». Asamblarea virionilor începe prin „încapsularea" genomurilor virale într-un complex nucleoproteic linear, prin acoperirea lor cu *proteina genei 5* (P5), proteină specială cu rol de „împachetare" intracelulară a ADN, diferită de proteina capsidală. Produsul genei 5 este un polipeptid cu g.m. ~ 9 689 dal (Nakashima 1974), prezent în celulă. Ca dimer se leagă de ADN în proporție de o moleculă de P5 la fiecare 4 nucleotide. Pe măsură ce are loc sinteza de proteine capsidale, acestea se asociază cu membrana plasmatică bacteriană la nivelul dublului strat lipidic.

Asamblarea fagului filamentos matur se face in membrana plasmatică bacteriană și este asociată cu ieșirea lui din celulă. Inițierea extruziei necesită intervenția proteinei minore de înveliș, care acționează ca *proteină-pilot* pentru a conduce transferul ADN prin membrana plasmatică. Cînd extruzia a început, P5 este desprinsă de ADN datorită sarcinilor ionice înalte ale suprafeței interne a dublului strat lipidic. Este probabil că în această perioadă ADN suferă o modificare de conformație, deoarece complexul ADN —P5 este mai lung și mai gros decît virionul (Pratt,

1974). ADN trece perpendicular prin membrana plasmatică, prin mijlocul unui grup de molecule de proteine capsidale, care formează o structură similară cu un por, şi în trecere formează un centru de condensare pentru proteina capsidală pe măsură ce este continuu extrudat. P5 nu este



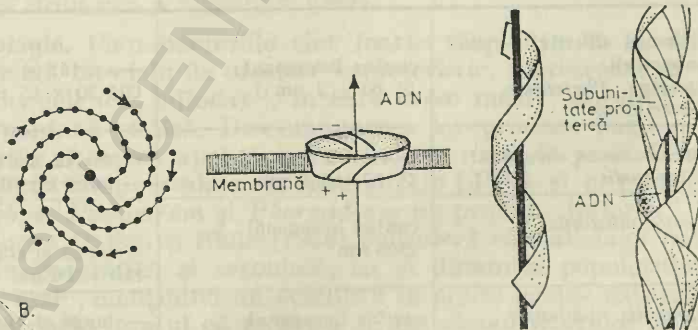


Fig. 117. — A. Reprezentarea schematică a fazelor de replicare a fagului fd *E. coli*. Imaginea prezintă infecţia celulei bacteriene pe calea pilului F (1) şi prin soluţii de continuitate ale peretelui celular, consecutive retracţiei şi depolimerizării pilului după legarea fagului sau degradării parţiale a peretelui celular la nivelul unor receptori specifici membranari (2). B. Asamblarea fagilor fd la nivelul membranei bacteriene ; modelul prezintă aşezarea helicoidală a subunităţilor proteice de înveliş în jurul moleculei de ADN, ieşind prin membrană ca un şurub (după Marvin şi Wachtel, 1976).

utilizată în cursul asamblării finale şi este probabil recirculată repetat în fazele iniţiale.

Virusul progen este eliberat din bacteria-gazdă care continuă să se dividă, probabil o generaţie, fără să o lizeze sau să o omoare (Hoffman-Berling, 1964), dar ulterior conţinutul celular trece la exterior prin numeroasele „găuri" lăsate de virionii extrudaţi. În celulă nu poate fi evidenţiat virusul matur infecţios, ci numai constituenţii lui (Trenkner, 1970).

Incapacitatea de a asambla virionii duce la moartea celulei prin întreruperea respiraţiei celulare (Hohn, 1971), probabil printr-o pierdere de protoni prin porii creaţi în membrana plasmatică de proteinele de înveliş, însoţită de distrugerea gradientului de protoni necesar pentru respiraţie (Mitchell, 1972).

Cianofagii

(Pl. 37, 38)

Cianofagii, cunoscuţi iniţial sub denumirea de ficovirusuri sau algofagi, sînt agenţi virali similari ca structură şi evoluţie bacteriofagilor şi care atacă o largă gamă de cianobacterii („alge albastre-verzi"); au fost descoperiţi de Safferman (1963). Clasificarea lor s-a făcut pe baza morfologiei, a specificităţii de gazdă şi a proprietăţilor serologice, iar denumirea s-a dat după iniţialele numelui de gen al gazdelor, la care se adaugă în cifre arabe subgrupul serologic (tabelul nr. 11).

Tabelul nr. 11

Principalele grupe de cianofagi şi caracteristicile lor (după Pelczar, 1977)

Grupul de cianofagi	Gazda specifică	Morfologie	
		Cap	Coadă
LPP-1 LPP-2	3 genuri diferite de cianobacterii: *Lyngbya, Plectonema, Phormidium*	contur hexagonal; Ø 60 ± 2 nm	— scurtă şi necontractilă 20 × 15 nm
SM-1	*Synechococcus elongatus* *Microcystis*	icozaedru Ø 67 × 1,8 nm	— foarte scurtă — guler cu fibre fine
N—1	*Nostoc muscorum*	contur hexagonal Ø55 nm	— lungă şi contractilă 110 × 16 nm
AS-1	*Anacystis nidulans* *Synechococcus cedrorum*	contur hexagonal Ø 90 nm	— lungă şi contractilă 243 × 22 nm

Structură. Cianofagul cel mai mult studiat aparţinînd grupului LPP-1 este asemănător *fagului E. coli* din seria T-impar, avînd capsida capului viral sub forma unui poliedru cu contur hexagonal (Ø 58,6 ± 2,1 nm), care sugerează o simetrie icozaedrică, şi o coadă scurtă (lungime

20 nm × 15 nm grosime) atașată la unul din vîrfurile capului. Coada apare cu o simetrie radială de tip 6, fiind alcătuită din 2—4 inele de 6 subunități, și prezintă o structură proximală — *capitelul cozii* — care proemină în capsida capului la joncțiunea cap—coadă, a cărei semnificație funcțională nu este cunoscută. Dacă se aplică legile de simetrie ca la fag, simetriei radiale de tip 6 a cozii ar trebui să-i corespundă o simetrie similară a capului sau în caz de simetrie diferită este necesară o structură intermediară, menită să asigure adaptarea unor simetrii diferite între cap și coadă. În felul acesta, capitelul ar putea avea rolul unei simple „articulații" mecanice necesară pentru a fixa capul de coadă sau de adaptor de simetrie în sensul sugerat, dacă cele două structuri ar avea tipuri diferite de simetrie.

Genomul este reprezentat de o moleculă de ADN d.c. lungă de 13,2 ± 0,5 µm.

Majoritatea cianofagilor izolați sînt virulenți. Unele tulpini se comportă de la izolare ca fagi temperați, capabili să inducă fenomenul de lizogenie.

Infecțiile cu cianofagi. Replicarea cianofagilor a fost studiată pentru cianofagul LPP-1 și cianobacteria *Plectonema borianum.* Fagul se adsoarbe pe peretele celular, cu extremitatea distală a cozii, după care coada perforează peretele celular și injectează ADN fagic, iar „umbrele" goale de conținut ale fagului rămîn pe suprafața celulei-gazdă.

Primul semn al infecției este reprezentat de invaginarea lamelelor fotosintetice. Spațiul dintre lamelele împăturite plisat și membrana plasmatică, în care vor apărea ulterior particulele virale, formează *stroma virogenă.* Apariția primelor particule virale se observă la circa 10 ore de la infecție. În mod obișnuit, dezvoltarea fagului nu este însoțită de modificări citologice majore în celula-gazdă pînă în faza premergătoare lizei. După liză, particulele virale se observă fie inclavate, fie adsorbite pe resturi de vezicule izolate, de mărimi diferite, fie pe lamele rupte.

În cazul virionilor atașați de membrane, coada este de două ori mai lungă decît cea a virionilor liberi.

Ecologie. Cianobacteriile sînt foarte răspîndite în mediul acvatic, unde prezintă un ciclu de creștere caracteristic, reprezentat de alternanțe între perioadele de „înflorire", în care cresc masiv, obișnuit vara, și de moarte spontană și liză. Descompunerea lor produce pagube economice enorme prin alterarea apei și mortalitate în masă la pești. Bazați pe răspîndirea practic universală a cianofagului tip LPP-1 și pe faptul că gazdele sale *Lyngbya*, *Plectonema* și *Phormidium* nu produc „înfloriri" Safferman (1967), Moriss, Padan și Shilo (1969) consideră că cianofagii pot influența distribuția geografică și sezonieră, ca și dinamica populațiilor de „alge albastre-verzi", menținînd un echilibru în multe bazine naturale acvatice. Pe de altă parte, faptul că moartea și liza cianobacteriilor au fost observate și în cazul unor specii care nu sînt atacate de virusuri arată că fluctuațiile numerice ale acestora și mai ales moartea și liza lor se datoresc, cel puțin în unele cazuri, unor cauze mai complexe. După cum s-a demonstrat experimental în condiții de laborator, ca și în condiții naturale în unele iazuri — este cert că cianofagii pot fi folosiți în mod eficient ca agenți de combatere ai algelor nedorite și în special ai „înfloririlor "algale.

Infecţii virale similare celor produse de cianofagi au fost demonstrate şi la unele alge eucariote ca *Scenedesmus armatus*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chorda tomentosa*, *Cyanophora* ş.a.

Micovirusurile

(Pl. 39)

Virusurile care atacă fungii — cunoscute sub denumirea de micovirusuri sau micofagi — sînt larg răspîndite şi infectează fungi aparţinînd tuturor categoriilor taxonomice majore. Descrise iniţial la ciuperca de cultură (*Agaricus bisporus*), au fost evidenţiate ulterior la peste 50 de genuri, între care numeroase microorganisme (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Saccharomyces*, *Candida* etc.). În cele mai multe cazuri, evidenţierea infecţiei virale a fost făcută în special la microscopul electronic, în altele însă virusul a fost izolat, purificat, caracterizat fizicochimic, iar patogenitatea lui demonstrată în baza postulatului lui Koch-Rivers. În general însă, virusurile fungilor sînt mai curînd latente decît litice, fapt care explică şi descoperirea lor atît de tardivă.

Structură. Cel mai bine studiat este virusul care infectează culturile de *Penicillium chrysogenum*, care se prezintă sub forma unor mici particule sferice sau poliedrice cu Ø de 33—41 nm. Particulele colorate negativ la microscopul electronic au contur hexagonal, ceea ce sugerează existenţa unei simetrii icozaedrice. Genomul este reprezentat de o moleculă de ARN d.c., de unde numele de *Mycorna* propus pentru a caracteriza aceste virusuri.

Replicarea nu a fost studiată foarte amănunţit, din cauza dificultăţilor tehnice legate în primul rînd de forma filamentoasă şi complexitatea structurală a celulelor-gazdă. Studiile de microscopie electronică sugerează o creştere a titrului şi a organizării virusurilor fungice paralel cu îmbătrînirea hifelor. La fungii filamentoşi care cresc prin alungirea apicală a hifei, micovirusurile sînt în general latente şi lipsesc din capătul tînăr (apical) al hifei, în timp ce în celulele bătrîne virusurile se agregă la întîmplare sau în şiruri cristaline extensive. În unele cazuri, în celulele bătrîne virusurile apar în vezicule delimitate de membrane, într-o citoplasmă normală.

Deşi celulele fungice infectate cresc adesea mai lent sau se dezvoltă anormal, ele nu se lizează constant deoarece suportă relativ bine infecţia virală, datorită acestei localizări intracelulare. Rezistenţa fungilor la liză nu este însă absolută. La unele tulpini de *P. chrysogenum* s-a descris formarea de plaje de liză, limitate la regiuni ale coloniei care prezintă creştere rapidă şi nediferenţiată. Formarea de plaje la fungi nu este comparabilă cu cea observată la bacterii, deoarece plajele nu sînt formate regulat de celulele care produc particule virale. Cel mai frecvent însă, eliberarea de virus se observă în culturile vechi şi este, probabil, consecinţa autolizei.

Virusurile au fost evidențiate în sporii fungilor, la titruri similare celor din hife, ceea ce asigură păstrarea și transmiterea lor în cursul fazelor nevegetative ale ciclului de viață fungic.

Patogenitate. Micovirusurile prezintă grade variabile de virulență, putînd produce infecții latente tipice sau infecții litice. De cele mai multe ori, miceliile infectate sînt evident bolnave, cresc mai lent, prezintă degenerare celulară și liză. Ele influențează în mod evident metabolismul gazdei, deoarece pentru a se replica intră în competiție cu sinteza proteinelor și a acizilor nucleici în celula-gazdă.

Infecția virală influențează negativ capacitatea unor fungi de a sintetiza metaboliți secundari neobișnuiți, de tipul antibioticelor sau al unor toxine *(aflatoxina)* sau exercită un efect antagonist asupra proprietăților de patogenitate ale unor fungi față de plantele superioare.

Transmiterea micovirusurilor. Liza extensivă a hifelor și eliberarea externă a micovirusurilor nu sînt necesare pentru transmiterea lor la alți fungi. Aceasta se face preferențial prin fenomenul de heterocarioză, care implică plasmogamie și deci schimb de citoplasmă între linii celulare fungice compatibile. Formarea de heterocarioni implică liza localizată între celulele adiacente compatibile, prin care se produce schimbul citoplasmatic.

Heterocarioza este caracteristică fungilor și este genetic controlată prin sistemele de incompatibilitate, în sensul că incompatibilitatea dintre fungi restrînge răspîndirea virusurilor prin heterocarioză și prin aceasta delimitează efectiv spectrul de gazde ale unui virus fungic.

Natura virusurilor

Inițial, virusurile au fost considerate ca substanțe chimice de tip cu totul special, înzestrate cu calități superioare, sau ca organisme primitive, cu dimensiuni foarte mici, dotate cu activități rudimentare.

Una dintre proprietățile virusurilor care a contribuit la menținerea îndelungată a acestei concepții a fost prezența în structura virusurilor a doi componenți definitorii pentru organismele vii, acizii nucleici și proteinele. Or, astăzi, este știut că nu moleculele componente dau sistemelor biologice proprietățile lor unice, ci nivelurile superioare de integrare în care ele sînt organizate.

O altă proprietate care a contribuit la considerarea virusurilor ca forme primitive de viață este replicarea lor, considerată inițial ca analogă procesului de multiplicare. Elucidarea bazelor moleculare ale replicării virale a risipit această confuzie: deosebirea dintre multiplicarea bacteriilor și replicarea virusurilor este esențială, în sensul că în timp ce bacteriile se multiplică independent, pornind de la ansamblul integrat al constituenților celulari, virusurile se replică obligator într-o celulă vie, pornind exclusiv de la genomul viral. Genomul viral reprezintă planul care dirijează în detaliu formarea virionilor, dar virusurile nu se multiplică singure, ci sînt multiplicate după modelul furnizat de informația genetică înscrisă în genom și *nu de genom*. În felul acesta virusul este „recopiat" în celulă. Informația genetică din genomul viral este tradusă în realitate, adică în virus, de celula-gazdă.

Concepția naturii vii a virusurilor este admisă astăzi de foarte puțini cercetători. După Luria (1973), un organism viu este „o entitate aparținînd unei descendențe continue, cu o istorie evolutivă individuală", iar din punct de vedere evoluționist, virusul este organism în mai mare măsură chiar decît o celulă din organismul unui metazoar, deși funcțional el este mult mai puțin independent decît oricare celulă. Luria consideră drept caracter esențial pentru *viață* capacitatea unui material de a reține, după izolarea sa, o configurație specifică și, prin aceasta, posibilitatea de a putea fi reintegrat în circuitul materiei vii. El identifică *viața* cu capacitatea de a produce un anumit tip de organizare, specific, independent „autoreplicant". După concepția lui — nu lipsită de exagerări — materialului genetic în general și chiar fragmentelor de ADN bacterian apte să producă transformarea genetică a bacteriilor prin recombinare genetică li se pot acorda atributul de viu.

Alţi autori, admiţînd că virusul separat nu poate fi considerat ca viu, acordă statutul de sistem biologic — adică de entitate care posedă toate proprietăţile viului — sistemului virus — celula-gazdă. Acest punct de vedere porneşte de la ideea că celula parazitată de un virus nu se comportă ca sediul reacţiei între două sisteme biologice separate şi distincte, ci trebuie concepută ca o unitate rezultată din integrarea celor două sisteme, în care genomul viral controlează procesele genetice şi metabolice ale celulei-gazdă în vederea perpetuării parazitului. Acest punct de vedere reprezintă însă o deplasare artificială a problemei, de la obiectul de studiu — virusul — la altul, cu totul diferit, ecosistemul virus — celula-gazdă infectată.

Cei mai mulţi autori aderă la punctul de vedere după care încadrarea virusurilor în lumea vie este imposibilă, artificială sau forţată. În fond, dificultatea majoră a încadrării virusurilor fără echivoc, într-o categorie sau alta, decurge din faptul că în prezent nu avem o definiţie unanim acceptată a vieţii, cele mai multe dintre definiţiile actuale reducîndu-se, în esenţă, la o enumerare a proprietăţilor observabile ale unui organism. Or, multe dintre aceste proprietăţi se întîlnesc şi la unele forme de organizare a materiei neanimate. Mai mult decît atît, la frontierele vieţii sau pe primele ei trepte, termenul de *viu* poate avea o semnificaţie şi o importanţă mult mai mică. Diferitele confuzii de ordin semantic agravează şi mai mult această situaţie. Este extrem de dificil de definit noţiunea de *viu*, după cum nici un cuvînt simplu nu poate caracteriza ceva care nu este viu (Crick, 1966). Szent-Györgyi (1971) manifestă un scepticism net faţă de posibilitatea de a defini viaţa „o proprietate care nu există, pe care nimeni n-a văzut-o". El consideră că a fi viu este o calitate a unor sisteme fizice, viaţa nefiind legată de o anumită structură sau entitate, ci este expresia colaborării armonioase a tuturor structurilor care alcătuiesc sistemul. Un punct de vedere similar este susţinut de Vandel (1968). Cu toate acestea, există mai multe încercări de a defini operaţional sistemele biologice.

După Crick (1966), un sistem biologic trebuie să întrunească trei necesităţi minimale: 1) capacitatea de creştere premergătoare multiplicării; 2) capacitatea de metabolism, de producere de energie şi de sinteză a moleculelor necesare pentru a se menţine şi reproduce şi 3) existenţa unui dispozitiv pentru producerea de descendenţi identici cu el, în trăsăturile cele mai importante.

Rashevsky (1969) defineşte organismele unicelulare ca o mulţime (în sens matematic) de gene, plus totalitatea activităţilor lor şi a produselor care rezultă, avînd anumite relaţii fie între toate, fie cel puţin între unele gene. Definiţia este, după autor, aparent iconoclastică, dar examinată atent este adevărată, pentru că, spre exemplu, într-un organism unicelular *totul*, fiecare structură, fiecare reacţie biochimică sau biologică, este un rezultat direct sau indirect al activităţii genelor.

Dulbecco (1969) consideră că viaţa poate fi concepută ca un ansamblu complex de procese, rezultînd din punerea în acţiune a instrucţiunilor codificate în acizii nucleici, care determină structura şi funcţia tuturor enzimelor celulare şi, în consecinţă, structura,multiplicarea şi funcţia celulelor.

Monod (1971), încercînd să explice proprietăţile fundamentale ale organismelor vii în termeni de mecanisme moleculare, consideră că sistemele biologice sînt singurele sisteme din univers dotate în mod obligator cu patru proprietăţi definitorii esenţiale: 1) *morfogeneza autonomă*, respectiv facultatea de a se construi ele înşile; 2) *emergenţa* sau proprietatea de reproducere care asigură continuitatea de la un individ la altul, fără ca să excludă inovaţiile. Ea reprezintă proprietatea de a reproduce şi multiplica structuri ordonate cu grad înalt de complexitate şi de a permite crearea evolutivă a unor structuri cu complexitate crescîndă; 3) *reproducerea invariantă la nivel molecular*, respectiv tendinţa de a reproduce şi transmite informaţia genetică corespunzînd propriei lor structuri — ereditar — de la o generaţie la alta, cu caracterul predominant *ne varietur*, fără a exclude variaţiile care pot apărea prin mutageneză sau recombinare genetică; 4) *teleonomia*, proprietatea de a avea o structură şi o organizare adaptate pentru a asigura supravieţuirea individului şi mai ales a speciei. Sistemele biologice au înscris în ele un proiect care traduce structura lor şi fiecare structură este adaptată pentru îndeplinirea unei anumite funcţii, are un anumit ţel. Depozitarul şi păstrătorul invarianţei este ADN, care are ca funcţie fundamentală *morfogeneza autonomă* şi *emergenţa*, datorită capacităţii sale de a purta mesajul genetic, de a se replica, de a regla activităţile sistemului şi de a suferi inovaţii (variabilitate). Proteinele, în special enzimele, sînt agenţii performanţelor teleonomice.

Prigogine (1967, 1972) consideră că sistemele vii sînt caracterizate prin prezenţa a două particularităţi importante, extrem de sofisticate: 1) *ordinea funcţională* reprezentată de mecanismele de coordonare ale miilor de reacţii chimice ale metabolismului şi 2) *ordinea arhitecturală* determinată de codul genetic şi reprezentată de structura macromoleculelor cu organizare spaţială foarte complexă, cu rol de catalizatori specifici (enzime) ai reacţiilor metabolismului. *Ordinea biologică*, reprezentată de însumarea ordinei funcţionale şi arhitecturale, are drept caracteristică fundamentală caracterul *ierarhic*: la nivel celular şi supracelular ea se manifestă printr-o serie de structuri şi funcţii cuplate, de complexitate crescîndă.

Spre deosebire de *sistemele izolate* (cristale) sau de cele *închise* (de ex., planeta Terra, care schimbă energie cu mediul), sistemele biologice care metabolizează şi se reproduc sînt *sisteme termodinamice deschise* (care schimbă energie şi materie cu mediul înconjurător). Aportul de energie şi materie se face în general în condiţii îndepărtate de echilibru, deoarece produşii de reacţie sînt fie respinşi de sistemul viu, fie vehiculaţi spre alte situsuri ale celulei pentru a efectua alte funcţii. În esenţă, apariţia, funcţionarea şi menţinerea sistemelor biologice s-ar face după modelul „structurilor disipative"*), care apar în sistemele deschise şi datorită cărora ordinea acestora „s-ar hrăni" din dezordinea înconjurătoare (Prigogine, 1972).

---

*) „Structurile disipative" sînt structuri create şi menţinute graţie schimburilor de energie cu lumea exterioară, în condiţii de lipsă de echilibru. Ele sînt asociate unui principiu de ordine diferit, caracteristic, numit „ordine prin fluctuaţie".

Pentru Lehninger (1975), cea mai remarcabilă proprietate a celulelor vii este capacitatea de a se reproduce ele înșile, cu fidelitate aproape perfectă, sute și mii de generații succesive. El caracterizează sistemul biologic elementar, celula vie, ca un sistem izotermic deschis, de molecule organice, capabil de autoasamblare, autoreglare și autoreplicare, care acționează pe principiul economiei maxime a părților și proceselor. Celula vie efectuează numeroase reacții organice secvențiale înlănțuite pentru transferul de energie și pentru sinteza constituenților proprii, prin intermediul catalizatorilor organici pe care îi produce ea însăși.

Alexander Rich (1980) caracterizează sistemele vii în funcție de fluxul diferitelor elemente și procese desfășurate în interiorul lor, admițînd existența a trei clase generale diferite : 1) sistemele biologice prezintă un *flux de materie* : substanțele chimice intră în celulă, sînt degradate și transformate în compuși celulari și alte substanțe chimice care părăsesc celula ; 2) prezintă un *flux de energie* : energia intră în sistemele biologice fie sub formă de energie chimică (asociată cu legături chimice), fie sub formă de energie radiantă solară care este captată, convertită la energie chimică și utilizată ; 3) au un al treilea flux, crucial ca importanță, *fluxul de informație* : un sistem viu nu este o mulțime de reacții chimice care se desfășoară simplu, la întîmplare, ci un sistem coordonat, sensibil și suplu, caracterizat prin controlul și reglarea diferitelor tipuri de reacții chimice.

Pentru Lwoff (1981), un organism viu este un sistem ordonat și independent de structuri și funcții integrate și interdependente, capabil de metabolism, creștere și reproducere. Ceea ce determină complexitatea unui organism superior organizat în raport cu un virus nu este complexitatea mai mare a moleculelor sale *luate izolat*, ci gradul mai înalt de organizare al acestor molecule, în sisteme ierarhizate, la nivele diferite, fiecare dintre ele fiind corelate și interacționînd cu toate celelalte și cu ansamblul lor, la rîndul lui corelat și reacționînd cu fiecare dintre ele.

Toate aceste date duc la concluzia că cele mai simple entități vii și în același timp unitatea fundamentală care stă la baza organizării tururor sistemelor biologice este *celula*.

Dintre toate celulele cunoscute, bacteriile reprezintă obiectul cel mai simplu, cea mai mică unitate de integrare și reproducere, care reunește calitățile de organizare, autonomie și invarianță prin care, după acordul general, se caracterizează ființele vii. Această concluzie este sintetizată de F. Jacob (1970) după care „bacteriile constituie, ca să spunem așa, un minimum vital. Cu ele debutează biologia moleculară, situîndu-se pe primul nivel de integrare, care caracterizează un organism, ignorîndu-le pe celelalte. Ele se instalează în mod deliberat la una din frontierele lumii vii, la limita cu neanimatul. Nivelul inferior lor se definește în termeni de chimie și de fizică, iar nivelul superior, în termeni de organizare, de sistem logic, chiar de mecanism automat..."

Tabelul nr. 1, care prezintă comparativ caracterele discriminatorii ale virusurilor față de cele ale bacteriilor luate ca prototip al unui sistem biologic simplu, prezintă 19 trăsături cu totul discriminatorii pentru cele

două lumi. Din compararea lor rezultă o totală lipsă de concordanţă şi absenţa oricăror legături între virioni şi bacterii, respectiv sistemele biologice, ceea ce demonstrează că virusurile nu pot fi considerate ca organisme. În afara celulei, particula virală nu este decît un obiect inert (Jacob, 1970). Şi „pentru că virusurile nu sînt nici organisme, nici celule, ele nu sînt fiinţe vii. Virusurile sînt virusuri, pentru că virusurile sînt virusuri'' (Lwoff, 1962, 1981). Această concepţie se reflectă în toate sistemele de clasificare ale lumii vii (Whittaker, 1969), care, indiferent de structura lor (cu două, trei, patru sau cinci regnuri), exclud virusurile şi implicit nu recunosc natura lor ca organisme.

Originea și evoluția vírusurilor

Există în prezent mai multe concepții care încearcă să explice apariția și evoluția virusurilor.

1) Virusurile ca molecule primordiale

Una dintre ipoteze consideră că virusurile actuale sînt descendenți direcți ai unui *protovirus* preistoric, în raport cu care nu au suferit mari modificări evolutive. La rîndul său, acest protovirus a apărut în primele etape ale evoluției vieții pe Pămînt din formele de viață precelulare. În absența unor celule-gazdă și a unor sisteme enzimatice, virusurile primitive utilizau pentru replicarea lor aminoacizii, polipeptidele și nucleotidele din oceanul primitiv, prin simpla adiție la structura lor a unor substanțe din mediu, identice cu cele din componența lor. Odată cu apariția organismelor celulare, conținutul în produși organici al oceanului primitiv a început să scadă, ceea ce a obligat virusurile să pătrundă în interiorul celulelor, adaptîndu-se la viața parazitară, pentru a supraviețui pe seama gazdei. Această ipoteză are multe elemente vagi, greu de explicat. În orice caz, între așa-numitul protovirus (virusul primitiv) și virusurile actuale există deosebiri atît de mari încît filiația propusă este greu de admis. Spre exemplu, replicarea lui se făcea în mii sau chiar sute de mii de ani, în timp ce virusul actual se multiplică în celula vie, după o cinetică bine determinată și în numai cîteva zeci de minute sau ore.

2) Virusurile—rezultat al unei evoluții regresive

Această ipoteză consideră că virusurile actuale ar fi descendenți degenerați ai unor microorganisme capabile inițial de viață independentă și ar reprezenta punctul culminant al unei lungi serii de transformări prin care, ca rezultat al adaptării la parazitism, microorganismele originare au suferit un proces de evoluție regresivă.

Ipoteza emisă, cu diferite modificări făcute de Green (1935), Laidlaw (1938) și Burnet (1945), ar putea fi sintetizată astfel : Pierderea capacității de sinteză a unor substanțe care nu pot trece prin membrana celulară a

obligat organismele ancestrale la parazitism intracelular. În această stare, primind de la celula-gazdă toate substanţele de care au nevoie, aceste organisme şi-au pierdut capacitatea de ale sintetiza singure, suferind — paralel cu reducerea pînă la dispariţie a echipamentului enzimatic, deci a funcţiilor metabolice proprii — şi o regresiune structurală marcată. Ele şi-au păstrat numai genomul, care le asigură replicarea, şi capsida proteică obţinută să-l protejeze.

Sprijinul principal al acestei ipoteze este furnizat de exemple, aparent analoge, din domeniul parazitismului, eveniment care apare frecvent în cursul evoluţiei (Nahmias şi Reanney, 1977). Acestea se bazează în special pe concepţia lui Lwoff (1943), care, studiind procesele de evoluţie fiziologică la microorganisme, a demonstrat posibilitatea pierderii unor funcţii prin procese de regresie fiziologică, determinate de adaptarea la viaţa parazitară (de ex., pierderea capacităţii de sinteză a unor metaboliţi (factori de creştere) sau a unor enzime ale metabolismului enzimatic etc.).

S-au încercat chiar reconstituiri ipotetice ale acestei evoluţii regresive, folosind pentru exemplificare o linie evolutivă reprezentată prin unele microorganisme actuale după schema : autotrofe → heterotrofe saprofite → saprofite condiţionat → parazite facultativ intracelulare → parazite obligat intracelulare → parazitism absolut (virusuri). Matthews (1975), reprezentînd grafic raportul dintre logaritmul greutăţii moleculare a genomului şi logaritmul masei particulei (volum) plasează *E. coli*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Pox*-, *Herpesvirus* şi diferitele virusuri ARN învelite într-o ordine care sugerează o complexitate descrescîndă. Graficul obţinut ar putea fi un sprijin pentru o evoluţie regresivă din celula bacteriană, cel puţin pentru unele virusuri.

Cu toate acestea, diferenţele de arhitectură moleculară şi de strategie genomică între diferitele virusuri sînt atît de mari încît o astfel de evoluţie este greu de explicat, deoarece virusurile actuale (chiar fagii care au păstrat o afinitate pentru celula bacteriană) nu au păstrat nici unul din caracterele distinctive ale celulei procariote. De aceea, tranziţia istorică de la structura celulară la virion este greu de conceput, deoarece nu se pot imagina treptele ei intermediare şi modul concret în care s-au realizat. De asemenea, sînt greu de imaginat factorii de selecţie sau mecanismele care au putut realiza această tranziţie, în absenţa unor intermediari între paraziţii celulari (*Rickettsia*), care îşi păstrează independenţa faţă de gazdă, şi virusuri care nu mai prezintă nici un vestigiu al organizării celulare. Capsida virală este analogă din punctul de vedere morfogenetic, mai curînd cu unele organite celulare ca microtubulii, filamentele de actină sau flagelii bacterieni, alcătuiţi din subunităţi proteice, repetate regulat şi capabile de autoasamblare (Joklik, 1974).

Există o singură excepţie, aceea a virusurilor din grupul *Pox*, care se abat de la structura generală a virionilor şi ar putea fi considerate ca descendente ale unor strămoşi celulari mai mari, deşi şi structura acestor virusuri (corpusculul central, învelişurile complexe) este greu de conciliat cu ipoteza evoluţiei regresive.

3) Originea virusurilor din material genetic celular

Bedson şi Waterson (1963) consideră că apariţia virusurilor este ulterioară aceleia a primelor celule. Ele ar deriva din porţiuni de genom celular — poate de cromosom bacterian — care, desprinse din cromosom şi ajunse libere în citoplasmă, au dobîndit, aici, o capacitate de reproducere superioară aceleia a gazdei lor celulare. Ca urmare, multiplicarea anarhică din punctul de vedere al economiei celulare a acestor particule autonome de material genetic a produs moartea celulei şi dezintegrarea ei, însoţită de punerea în libertate a particulelor progene. Acestea au „supravieţuit" temporar şi au căpătat proprietatea de a pătrunde în celule noi şi de a se multiplica în interiorul lor, trecînd astfel în serie de la o gazdă la alta, iniţial sub formă de acid nucleic infecţios „dezgolit", adică lipsit de un înveliş protector. Cu timpul, probabil prin adiţia de material genetic provenit din unele celule-gazdă, genomul transferat în serie a căpătat posibilitatea de a dirija sinteza de către celula infectată a unor proteine speciale din care s-a constituit capsida, care, protejînd genomul, diminuă riscurile pe care le comportă existenţa extracelulară, fie ea şi tranzitorie, şi măreşte infecţiozitatea virusului, adică aptitudinea lui de a ataca în mod eficace noi celule-gazdă.

Cunoştinţele actuale asupra formării şi evoluţiei plasmidelor bacteriene şi a capacităţii lor de a se integra în ADN cromosomal, de a se replica cu el şi de a se exciza corect sau incorect (cu desprinderea unor gene cromosomale) au adus argumente în favoarea acestei concepţii. Fagii ar putea proveni din segmente de ADN celular, care după ce dobîndesc capacitatea de replicare autonomă (repliconi) devin plasmide. Prin procese succesive de integrare şi excizie eronată acestea desprind din genomul celular gene care asigură sinteza proteinelor structurale ale capsidei. Cînd o astfel de plasmidă scapă de controlul cromosomal şi este transmisă la o gazdă nouă, devine dăunătoare pentru aceasta şi formează un bacteriofag.

Virusurile parazite ale celulelor eucariote au apărut printr-un mecanism similar din elemente genetice celulare (gene „vagabonde" sau „rătăcitoare" — „Vagrant genes" — Waterson, 1963) provenite foarte probabil din mitocondrii, cloroplaste, kinetoplastele protozoarelor sau din complexele ARN—proteine, care au devenit autonome şi s-au putut replica, producînd dezordini în celula-gazdă. Procesul a avut loc corelat cu evoluţia celulelor primordiale, cînd transferul de informaţie genetică între diferite tipuri de celule se făcea foarte uşor. Geneza virusului primitiv *(Archaeovirus)* din polinucleotide celulare s-ar mai fi putut produce cu foarte mare probabilitate, după Joklik (1974), în cursul embriogenezei unor organisme, cînd rata diviziunilor celulare, în cursul ontogeniei precoce, este foarte mare şi virusul trece prin milioane de generaţii celulare, cu potenţial imens de variaţie şi selecţie, fiind în acelaşi timp răspîndit la descendenţii celulei progenitoare.

Procesul este favorizat la metazoarele superioare de faptul că virusul produs în cursul embriogenezei este recunoscut ca „propriu" („self")

de către sistemul imun al gazdei şi prin aceasta nu declanşează reacţiile de apărare, care ar putea duce la eliminarea lui.

4) Originea virală a unor virusuri

Ţinînd seama de tendinţa spre variabilitate prezentată de elementele genetice extracromosomale, a fost emisă ideea că foarte multe virusuri fenotipic diferite s-au dezvoltat dintr-o „biounitate ancestrală", în sensul că unele virusuri au evoluat nu de la alte celule şi nici de la polinucleotidele unei celule, ci de la alte virusuri. O evoluţie de această natură implică intrarea în acţiune a cel puţin două mecanisme, unul capabil să determine modificări ale dimensiunii genomurilor, iar celălalt de schimbare a structurii virionilor. Modificarea mărimii genomului viral este relativ uşor de explicat, în sensul diminuării prin deleţie sau al creşterii prin duplicarea genelor, adăugarea unor segmente suplimentare din genomuri înrudite sau neînrudite, cu şi fără reunire prin ligaze (ca genom segmentat), integrare în genomul celulei-gazdă, urmată de excizie anormală etc. În schimb, modificările structurii capsidelor virale şi modul în care un tip de virion a evoluat din altul anterior sînt mult mai greu de explicat, mai ales în cazul virionilor icozaedrici care au o structură foarte precis fixată. Astfel, capsida unui *Adenovirus* nu poate tolera pierderea unui polipeptid pentonic şi nici măcar diminuarea dimensiunilor lui, ceea ce face improbabilă evoluţia virusurilor actuale dintr-un virus ancestor unic.

Ca dovezi în sprijinul acestei concepţii ar putea fi citate absenţa unor forme intermediare între cele aproximativ treizeci de grupuri morfologice de virusuri, precum şi structura replicazei fagului Qβ, care este constituită din patru polipeptide: trei aparţinînd „maşinăriei" de sinteză a celulei-gazdă şi una de origine virală. Or, este improbabil ca asocierea lor într-o enzimă activă să fie datorită întîmplării ori adăugării ulterioare a polipeptidelor celulare la o polimerază virală care a evoluat independent (Joklik, 1974).

În cadrul aceleiaşi ipoteze, Temin (1976) susţine că unele virusuri cu genom ADN au evoluat de la virusuri ARN, în sensul că ADN format prin transcrierea inversă a ribovirusurilor ar putea fi precursorul unor virusuri animale mai mici, cu genom ADN.

5) Originea virusurilor ARN

Originea virusurilor ARN reprezintă un caz mai special şi mai greu de explicat. Au fost propuse mai multe ipoteze.

a) Virusurile ARN s-au format în acelaşi mod ca şi virusurile ADN într-o perioadă cînd celulele primordiale posedau elemente genetice autonome care conţineau ARN. Este probabil că şi celulele actuale ar poseda capacitatea de a replica ARN, dar acest sistem nu a fost încă identificat. Un exemplu posibil de sistem celular capabil să replice ARN ar fi metagonul de la protozoare (Sonneborn, 1965).

b) Virusurile ARN ar avea originea în alte virusuri cu genom ADN. Deşi cele mai multe ipoteze pledează pentru apariţia independentă a virusurilor ADN şi ARN ar exista posibilitatea ca virusurile ARN să derive din virusuri ADN. Mai precis, genomul virusurilor ARN ar fi la origine ARNm al unui virus ADN, care a dobîndit capacitatea de a se replica autonom (replicon) şi odată cu aceasta autonomia faţă de matriţa iniţială pe care s-a format (genomul viral ADN).

c) Virusurile ARN ar fi descendenţii unor structuri care conţin ARN şi care au dobîndit capacităţi de replicare. Astfel de structuri au fost probabil asemănătoare complexelor ribonucleoproteinice, care par să reprezinte forma în care ARNm este transportat din nucleu în citoplasmă (Joklik, 1974).

6) Originea retrovirusurilor

Retrovirusurile (Rnadnavirusurile) reprezintă un alt caz particular în lumea virusurilor, care ridică probleme speciale în legătură cu originea lor. Şi în acest caz au fost emise mai multe ipoteze.

Ipoteza protovirusului

Ipoteza protovirusului, expusă în mai multe variante (Temin, 1976), consideră că retrovirusurile au apărut intracelular printr-un proces de evoluţie eronată, ca rezultat al variaţiilor care s-au produs accidental în cadrul unui sistem normal de transfer de informaţie, după schema: ADN → ARN → ADN, la nivelul unor anumite segmente din genomul celular. În cursul unor transferuri succesive de informaţie, după această schemă, au loc modificări în genomul celular, care au ca rezultat acumularea de modificări în secvenţa acizilor nucleici, pînă cînd ia naştere genomul unui virus infecţios. În cazul în care acest genom se desprinde de genomul celular, el dă naştere unui *ribodezoxivirus* (retrovirus), care poate infecta alte organisme.

Într-o variantă mai recentă, Temin (1980) consideră că virusurile ARN puternic transformante (de ex., virusul sarcomului Rous) ar deveni oncogene numai după ce se recombină cu unele gene celulare specifice, care au evoluat independent spre starea de „gene de cancer". Aceste gene endogene înrudite cu retrovirusurile fac parte din genomul celular normal. Ele au luat naştere, de asemenea, prin evoluţie eronată, ca rezultat al variaţiilor care au apărut în cursul transferului repetat de informaţie, după schema ADN → ARN → ADN, la nivelul anumitor segmente din genomul celular.

Evoluţia retrovirusurilor din elementele genetice transpozabile celulare

Elementele genetice transpozabile*) sînt entităţi definite structural, sub forma unor segmente din molecula de ADN, care se pot integra

*) Problema elementelor genetice transpozabile va fi tratată *in extenso* în volumul II.

repetat în mai multe situsuri într-un genom şi, ca urmare, se pot deplasa de la o anumită poziţie în genomul bacterian într-o altă poziţie în acelaşi genom sau în genomuri diferite. Ele sînt cunoscute sub denumirea de secvenţe de translocaţie (Novick, 1976), elemente translocabile (Kleckner, 1977) sau elemente de inserţie (Campbell, 1979). Descrise iniţial la porumb (McClintock, 1956), au fost evidenţiate la bacterii (Saedler şi Starlinger, 1972) sub forma „genelor care sar", corespunzînd la trei tipuri de organizare: secvenţele de inserţie, transpozonii şi fagul Mu. Structura lor genetică este foarte asemănătoare cu aceea a retrovirusurilor, al căror provirus este mărginit de lungi secvenţe repetate, directe, care la rîndul lor se termină cu scurte secvenţe repetate, directe.

Shimothno şi Temin (1981) consideră că asemănările dintre retrovirusuri şi elementele transpozabile nu pot fi datorate întîmplării şi nu se pot explica decît fie printr-o evoluţie convergentă, fie prin evoluţia retrovirusurilor din elemente transpozabile (Temin, 1980). Bazîndu-se pe cunoştinţele referitoare la formarea şi variaţiile transpozonilor ei au imaginat următoarea schemă de evoluţie a retrovirusurilor: strămoşul prim al retrovirusurilor ar fi fost un mic element genetic mobil, de tipul secvenţelor de inserţie (IS), care conţinea informaţia genetică necesară pentru controlul transcrierii acestei informaţii. Dacă două elemente de acest tip sînt legate prin transpoziţie la extremităţile unei gene care codifică ADN-polimeraza, ele formează transpozonul „ADN-polimerază" care poate deveni precursorul transcriptazei inverse virale. Procesul s-ar repeta de mai multe ori în jurul unor gene celulare capabile să codifice precursori ai unor proteine virale în aşa fel încît transpozonul transcriptază inversă înglobează rînd pe rînd genele care codifică proteinele capsidale şi constituenţii învelişului viral. Virusurile cu proprietăţi oncogene crescînde s-ar forma deci prin procese de amplificare a genelor, consecutive transpoziţiei repetate a unor elemente genetice transpozabile, urmată de integrarea şi legarea genelor celulare învecinate care codifică diferite tipuri de proteine ale viitorului virion. Retrovirusurile nu ar fi deci decît transpozoni evoluaţi care, în final, se pot desprinde de genomul celular, putînd fi transmise la alte celule.

În sprijinul acestei concepţii pledează date recente experimentale, care demonstrează că transformarea oncogenă prin retrovirusuri corespunde unui proces de translocaţie: genele răspunzătoare de formarea tumorilor provin din celula-gazdă şi îşi datorează caracterul oncogen unei exprimări aberante sub controlul unor promotori virali (Duesberg, 1980). Acestei ipoteze i s-a adus drept critică faptul că elementele genetice transpozabile au fost descrise pînă în prezent numai la porumb, bacterii, levuri şi *Drosophila*, nu însă şi la vertebrate, care reprezintă singura gazdă naturală a retrovirusurilor.

Originea celulară a retrovirusurilor

Huebner şi Todaro (1969) au sugerat că genele oncogene ale retrovirusurilor ar fi în realitate constituenţi ai materialului genetic normal al tuturor celulelor, dobîndite de acestea probabil foarte timpuriu în cursul evoluţiei în urma unei infecţii virale. Ele sînt inofensive atît timp cît

rămîn inactive, dar devin oncogene dacă sînt stimulate de un agent cancerigen.

Ipoteza originii celulare a retrovirusurilor a fost reformulată de Bishop (1981, 1982) într-o variantă care reprezintă o posibilă „cale comună finală a tumorigenezei", legată de o familie de gene a căror alterare sau exprimare anormală în celulă poate fi cauza cea mai apropiată a transformării maligne. El consideră că genele oncogene descrise iniţial la virusuri nu le sînt proprii acestora, ci ar fi copii ale unor gene celulare, care au fost adăugate unor genomuri virale preexistente (neoncogene), într-o perioadă nu prea îndepărtată în trecut. Procesul ar putea continua şi în prezent.

Ipoteza se bazează pe faptul că genomul retrovirusurilor — de exemplu virusul sarcomului aviar Rous (VSR) — este format din 4 gene, dintre care una, gena *v-src*, codifică o proteină capabilă să inducă sarcomul la păsările infectate. Prezenţa unor gene foarte asemănătoare (*c-src* sau *sarc*) în genomul celulelor normale la toate vertebratele studiate (de la peşti pînă la mamifere) a permis ipoteza că gena *v-src* şi alte gene oncogene din structura retrovirusurilor ar avea originea în celulele animale. Cu alte cuvinte, diferitele retrovirusuri ar fi devenit oncogene după ce au desprins din genomul mare al celulei animale cîteva gene dotate cu potenţial de inducere a transformării maligne. Genele animale originare de la care au fost derivate oncogenele retrovirusurilor au fost numite „protooncogene" (Bishop, 1981).

În concluzie, retrovirusurile oncogene au luat naştere prin recombinarea rară între un retrovirus neoncogen şi genele *c-src* sau *onc* (caracteristică virusului leucemiei acute) din celula animală normală. Recombinarea a avut loc probabil după integrarea retrovirusului ca provirus imediat lîngă gena *c-src* celulară, care după integrare în genomul viral a evoluat spre gena *v-src*, caracteristică VSR actual.

În mod obişnuit, „protooncogenele" celulare nu induc transformarea malignă, ci numai după integrarea lor în genomul unui retrovirus. Acest fenomen ar putea fi explicat pe mai multe căi:

— în forma lor integrată în genomul viral ele ar putea fi exprimate (traduse în proteine) în mod diferit sau mult mai intens;

— există posibilitatea ca infecţia virală să modifice exprimarea chiar a genelor celulare, demascînd potenţialul lor oncogen;

— este posibil ca infecţia virală să fie *numai una* din cauzele care pot „demasca" un protooncogen.

În sprijinul acestei concepţii se menţionează lucrările lui Weinberg şi Cooper (1980), care au demonstrat capacitatea unor cancerigeni chimici (metilcolantren) de a activa protooncogenele şi de a induce transformarea malignă celulară. ADN extras din aceste celule este capabil să transforme unele celule în continuare, în absenţa unei infecţii concomitente cu retrovirusuri. Se demonstrează astfel că: a) grupul de gene din celulele de mamifere modificate sau dereglate de un cancerigen chimic pot deveni gene transformate; b) ADN legat de un agent chimic este el însuşi cancerigen; c) la nivel genetic, în cancerogeneza chimică se pot produce aceleaşi evenimente ca şi în cea mediată de retrovirusuri. Este foarte posibil ca în ambele cazuri să acţioneze aceleaşi gene.

Menţinerea protooncogenelor de-a lungul evoluţiei, reflectată în prezenţa genelor *c-src* şi *onc* la toate vertebratele studiate, este o dovadă că aceste gene au existat la un strămoş comun, apărut cu multe milioane de ani înainte, şi că ele ar avea o importanţă esenţială în economia celulei normale, probabil în reglarea creşterii celulare şi a dezvoltării (Bishop, 1982), ca explicaţie a menţinerii ei la acest nivel.

Modul de apariţie a virusurilor

Virusurile au apărut în urma unor evenimente repetate şi independente. În sprijinul acestei concepţii pledează faptul că în prezent există peste 30 de tipuri majore de virusuri şi că în contrast evident cu gradaţia infinită observată între celule şi organisme nu există intermediari între cele peste 30 de grupuri structurale de virusuri. În plus, dacă modificările genomului viral sînt uşor de explicat, cele ale capsidei sînt foarte greu sau imposibil de justificat. Genomul viral poate să scadă ca mărime prin deleţie şi să crească prin adăugarea de fragmente din genomuri înrudite sau neînrudite, cu sau fără unirea lor prin ligaze *(genom segmentat)* sau prin integrare şi excizie anormală, cu preluarea unor gene din genomul celulei-gazdă. Capsida icozaedrică însă este foarte riguros structurată şi nu poate exista după pierderea unei capsomere şi nici prin diminuarea dimensiunilor ei.

Unele virusuri care aparţin aceluiaşi grup major pot avea un strămoş comun, altele nu. Componenţii anumitor grupuri majore cu morfologie comună ar putea avea origine comună, ca, de exemplu, unele virusuri care infectează insectele şi vertebratele sau insectele şi plantele. Grupul ancestor poate să fie originar la insecte (care reprezintă factorul comun) de la care au evoluat în variante capabile să se multiplice la plante şi animale sau ar putea fi originar fie la plante, fie la vertebrate, urmate de transferul de la unele la altele, pe calea insectelor vectoare. Nu totdeauna însă virusurile dintr-un grup pot avea un strămoş comun, ca, de exemplu, grupul virusurilor ARN icozaedrice mici, care includ fagii MS2 şi Qβ, virusurile plantelor (mozaicul obsigei (Bromus) ,,turnip yellow mosaic virus'', ,,Bushy stunt''), virusuri ale insectelor şi picornavirusurile mamiferelor, atît de deosebite între ele.

Cu excepţia posibilă a fagilor cu coadă, virusurile nu au evoluat unul din altul. Principalul argument în sprijinul acestei concepţii este lipsa unor forme intermediare între membrii diferitelor grupuri morfologice.

Coada fagilor reprezintă singura structură virală care prezintă variaţii în complexitatea morfologică şi funcţională, care ar putea fi datorate unei căi evolutive. Cozile fagilor pot fi simple, lungi şi necontractile, foarte scurte, ca nişte tuburi groase lipsite de structuri de fixare, contractile cu buton la capătul distal sau cu placă bazală, croşete şi fibre. Faptul că fagii cu cozi de un anumit grad de complexitate nu sînt limitaţi la un anumit grup de bacterii, precum şi faptul că cele mai multe bacterii pot fi infectate cu fagi cu grade diferite de complexitate structurală a cozii pledează pentru ideea că fagii cu coadă au o origine comună.

Faptul că genele implicate în formarea constituenţilor cozii sînt grupate riguros pe genom, în aşa fel încît gruparea lor reflectă nivelul de expresie a genelor (gene pentru polipeptide necesare în număr mic (5); cele necesare pentru un număr de copii intermediar (6–24), respectiv pentru număr mare de copii (> 100), totul formînd un sistem genetic integrat (King şi Laemmli, 1973), pledează pentru ideea că la fagi cozile mai complexe au evoluat din cele mai simple.

Nu se cunoaşte încă şi nici nu se poate explica natura avantajului selectiv conferit de creşterea în complexitate a cozii, deoarece fagii simpli sînt la fel de eficienţi ca şi cei cu cozi foarte complicate. În concluzie, evoluţia virusurilor a urmat căi şi mecanisme care le sînt absolut proprii.

Faptul că virusurile animale au proprietăţi genetice similare cu cele ale celulelor în care se replică, este o dovadă în plus că ele au evoluat inevitabil paralel şi similar cu evoluţia speciilor pe care le parazitează, pentru a utiliza cu avantaje maxime ,,maşinăria'' de sinteză a acestora (Dulbecco, 1979).

Clasificarea şi nomenclatura virusurilor

Sistematica şi taxonomia virusurilor au întîmpinat dificultăţi incomparabil mai mari faţă de cele întîlnite de sistematica bacteriană. Din cauza imposibilităţii de a le izola şi studia direct, în trecut, foarte multă vreme, virusurile au fost denumite după numele şi simptomele bolilor sau după modificările morfologice şi ultrastructurale pe care le produc.

Bawden (1941) a propus ca sistemele de clasificare să se bazeze pe proprietăţile virusurilor şi nu pe manifestările patologice induse de ele, care pot varia nu numai de la o gazdă la alta, dar chiar la aceeaşi gazdă, în funcţie de anumiţi factori fiziologici, de rezistenţă etc.

Epidemiologii au recomandat o clasificare bazată pe criteriul mecanismului de transmitere a infecţiei, care deşi lipsită de semnificaţie taxonomică este folosită şi în prezent, grupînd virusurile : respiratorii, enterice (enterovirusurile), arbovirusuri etc.

Andrewes (1952) a propus gruparea virusurilor pe criterii de asemănare şi denumirea lor cu un nume latinizat, constituit dintr-un prefix care le caracterizează + cuvîntul virus. În felul acesta au apărut iniţial denumirile de *Myxovirus* (Andrewes, 1955), *Poxvirus* (Fenner, 1957) ş.a.

Definirea conceptului de virion (Lwoff, 1953) a atras atenţia asupra caracterului unitar al lumii virusurilor, fapt reflectat şi în sistemul de clasificare propus de Lwoff, Horne şi Tournier (1962). Sistemul LHT, care încearcă o primă clasificare ştiinţifică a lumii virusurilor considerată ca un ansamblu, este bazat pe patru caractere luate ca părţi esenţiale ale unui întreg : 1) natura materialului genetic ; 2) tipul de simetrie a capsidei ; 3) prezenţa sau absenţa învelişului extern şi tipul de nucleocapsidă ; 4) unele date de ordin cantitativ (la virusurile helicale diametrul capsidei, la cele icozaedrice numărul de capsomere şi numărul de triangulare).

Gibbs (1966) şi Wildy (1971) au propus descrierea familiilor şi a genurilor virale pe baza unor *criptograme*, în care figurează sub o formă codificată mai multe caractere, care permit identificarea unui virus.

Primul termen al criptogramei se referă la tipul de acid nucleic : R = ARN ; D = ADN ; 1 = monocatenar ; 2 = dublucatenar. Al doilea termen se referă la greutatea moleculară a genomului viral (în milioane daltoni) şi la procentajul acidului nucleic în virion. Cînd genomul este divizat şi segmentele sale se găsesc în acelaşi virion se utilizează simbolul „Σ", urmat de o cifră care indică greutatea moleculară totală a genomului. Al treilea termen se referă la morfologia virionului, respectiv la

forma capsidei: S = sferică; E = alungită cu laturi paralele şi extremităţile nerotunjite; U = alungită cu laturi paralele şi extremităţile rotunjite; X = complexă. Cel de-al patrulea termen descrie tipul de gazdă infectată (V = vertebrat; I = nevertebrat) şi modul de transmitere (0 = fără vector de răspîndire; Di = vector dipter; Ac = căpuşe sau acarieni; Si = purece). Proprietăţile încă necunoscute sînt marcate cu un asterisc.

Prin acest sistem se pot crea, pentru fiecare virus, fişe de identitate, care permit clasificarea în funcţie de un număr mai mare sau mai mic de caractere comune, iar criptogramele minimale ale unor virusuri au următorul conţinut: *Herpes virus* [D/2 : 80—100/7 : S/S : V/0]; *Poxvirus* [S/2 : 160—200/5—7 : X/*: V/0, Di, Ac, Si]; *Picornavirus* [R/1 : 2,5—2,8/30 : S/S : V/0]; *Orthomyxovirus* [R/1 : Σ 5/1 : S/E : V/10].

Sistemul este apropiat de taxometria folosită în clasificările biologice, dar, după mulţi specialişti, nu permite o clasificare logică a virusurilor. Pe măsură ce numărul virusurilor identificate a crescut şi gama caracteristicilor lor s-a îmbogăţit au fost elaborate sisteme de clasificare noi, care folosesc un număr important de caractere, de exemplu: natura genomului (ARN sau ADN) şi particularităţile lui fizicochimice (g.m., mono- sau dublucatenar, linear, circular, segmentat, raportul de baze G + C % etc.), simetria capsidei (helicală, icozaedrică sau complexă), mărimea virionului (g.m., dimensiuni), numărul capsomerelor, prezenţa sau absenţa învelişului extern, locul de asamblare a capsidei, locul de formare a învelişului extern (membrana nucleară sau plasmatică), prezenţa lipidelor şi carbohidraţilor, proprietăţile antigenice, particularităţile replicării şi unele proprietăţi biologice (spectru de gazde etc.).

Pe baza acestor criterii, virusurile cunoscute au fost grupate în *familii* şi subdivizate în *genuri*. Nu s-au putut stabili însă categorii taxonomice superioare familiei.

De asemenea, foarte mulţi autori consideră că în prezent nu dispunem de date suficiente privind proprietăţile virusurilor, care să permită o subdiviziune a genurilor în specii sau grupuri de tulpini. Deşi unii autori (Mattews, 1979) consideră conceptul de specie ca inaplicabil virusurilor, în realitate, posibilităţile de delimitare a speciei virale diferă mult de la un grup la altul. În timp ce la multe din virusurile plantelor conceptul pare inaplicabil, unele virusuri ale vertebratelor, de exemplu genul *Enterovirus* poate fi uşor divizat într-un număr substanţial de specii (Mattews, 1979).

De menţionat că unele criterii trebuie folosite cu discernămînt. Astfel, deşi membrii fiecăreia din familiile majore de virusuri derivă, probabil, dintr-un strămoş comun, relaţia genetică dintre ei nu mai este discernabilă în prezent. Astfel, diferitele virusuri din grupul *Pox* (care infectează omul, vaca, iepurele, maimuţa şi şoarecele) sau din grupul *Herpes* (uman, simian, canin şi aviar) apar ca neînrudite genetic, dacă sînt analizate pe baza hibridării ADN şi a reacţiilor imunologice încrucişate. Totuşi, în fiecare din familiile majore există virusuri care prezintă înrudiri de diferite grade, ceea ce permite divizarea familiilor respective în subfamilii.

Regulile de nomenclatură a virusurilor propuse de Comitetul Internaţional de taxonomie a virusurilor (Fenner, 1976) menţionează: nomenclatura să fie internaţională şi să se aplice universal tuturor virusurilor,

cu efortul de a folosi nomenclatura latinizată; nu se recomandă utilizarea nomenclaturii binominale (lineană), folosită în codul de nomenclatură bacteriană; să se accepte unele sigle ca denumiri de virusuri sau grupuri de virusuri cu condiţia ca ele să aibă un sens şi să fie recomandate de Comitetul Internaţional (spre exemplu, ***Reo****virus* pentru **R**espiratory **E**nteric **O**rphan sau *Picornavirus* de la l. *pico* = mic + RNA; ***Tobra****virus* de la **To**bacco **Ra**ttle).

Pentru motive pragmatice, *specia* este considerată ca un grup de virusuri care au calităţi asemănătoare, iar *genul* un grup de specii care au o serie de caractere comune şi caracterizat prin adăugarea sufixului... *virus* la numele virusului: de ex., *Herpesvirus*, *Adenovirus*. *Familia* este un grup de genuri cu caractere comune şi se desemnează adăugînd la numele virusului terminaţia... *viridae*: de ex., *Herpesviridae*, *Adenoviridae* etc.

În practică se folosesc şi denumiri vernaculare, sub forma unor combinaţii de litere şi numere, ca în cazul virusului SV40 (Simian vacuolant), ca şi clasificări şi nomenclaturi convenţionale bazate pe criterii epidemiologice, ca modul de transmitere (*Arbovirus*) sau de localizare (*Enterovirus*). În realitate, unele dintre aceste grupuri, ca, de exemplu, grupul *Arbovirus* (*Arthropode* borne viruses) care include virusuri transmise prin intermediul artropodelor, reunesc virusuri foarte diferite, aparţinînd unor genuri taxonomice distincte — *Toga-*, *Reo-*, *Rhabdo-*, *Arena-*, *Picornavirus* etc. (Hannoun, 1971), (tabelul nr. 12).

Tabelul nr. 12

Clasificarea şi nomenclatura virusurilor şi principalele caracteristici folosite drept criterii în taxonomia virală (după date din literatură)

Caracterizarea	Familia sau grupul	Tipul sau specii mai importante	VIRION				GENOM					Unele caracteristici principale
			Simetria	Mărimea (nm)	g.m. × 10^6 dal	Nud sau învelit	Natura	Tip de structură	g.m. × 10^6 dal	Sens «+» sau «—»	% G+C	
Virion nud cu simetrie icozaedrică, genom ADN m.c.	*MICROVIRIDAE* (gr. *micros*=mic)	*FAG Φ X 174* (enterobacteriacee)	I	Ø 27	6,7	N	ADN	m.c. circular	1,5 × 10^6		44	12 capsomere şi spicule în buton la vertexuri
	PARVOVIRIDAE (*l. parvus*= mic)	*PARVOVIRUS* virus Kilham la şobolan; virus asociat cu adenovirus; *Densovirus* la lepidoptere	I	Ø 18—22	5,5—6,2	N	ADN	m.c. L	1,5—1,8		41—53	32 capsomere: 20(VI) +12 (V)
Virion nud cu simetrie icozaedrică, genom ADN d.c.	*PAPOVAVIRIDAE* (de la *papilom*, *poliom*, *vacuolant*)	*PAPILLOMA* papilom Shope la iepure *POLYOMAVIRUS* poliom la şoarece *SV40* v. simian vacuolant	I	Ø 45—55	25—47	N	ADN	d.c. circular	3,5—5		41—49	72 capsomere: 60(VI) + 12(V)
	ADENOVIRIDAE (gr. *adenos*=glandă; *mastos*=sîn; l. *avis* = pasăre)	*MASTADENOVIRUS* (mamifere) Adenovirus uman *AVIADENOVIRUS*	I	Ø 70—90	170	N	ADN	d.c. L	23—30		48—61	252 capsomere: 240 (VI) + 12 (V); capsidă complexă; spicule filamentoase sau fibrilare la pentoni
	IRIDOVIRIDAE (gr. *iridos*=iridescent după aspectul larvelor bolnave şi al concentratelor de virioni)	*IRIDOVIRUS* V. *Tipula iridescent* V. pestei porcine africane *RANAVIRUS*	I	Ø130—300	500—2000	N	ADN	d.c. L, posibil 2 molecule în virion	130		?	structură complexă, 1 500 capsomere; fosfolipide incluse în capsida icozaedrică; unele genuri au virioni cu înveliş derivat din membrana celulară

*) I, simetrie icozaedrică; N, nud; m.c., monocatenar; L, linear; (VI), hexamere; (V), pentamere; d.c., dublu catenar; IE, înveliş extern; SH, suprahelical; H, simetric helicală.

Tabelul nr. 12 (continuare)

Caracterizarea	Familia sau grupul	Tipul sau specii mai importante	VIRION				GENOM					Unele caracteristici principale
			Simetria	Mărimea (nm)	g.m. × 10^6 dal	Nud sau învelit	Natura	Tip de structură	g.m. × 10^6 dal	Sens «+» sau «—»	% G+C	
	CAULIMOVIRIDAE (de la cauliflower + (mosaic)	*CAULIMOVIRUS* V. mozaicului conopidei V. mozaicului dalici	I	Ø 50	22,8	N	ADN	d.c. circular deschis sau linear	4,7		?	72 capsomere : 60(VI) + 12(V)
Virion cu înveliș extern și simetrie icozaedrică, genom ADN d.c.	*BACULOVIRIDAE* (l. *baculum*=baston)	V. poliedrozei nucleare	I	bastonaș 40–70 × 250–400	~1 000	IE	ADN	d.c. SH	58–100		28–59	virionii formați din una sau mai multe nucleocapside acoperite de o membrană de înveliș pentru a da o structură baciliformă
	HERPESVIRIDAE	*HERPES SIMPLEX* (alpha herpesvirus v. varicelei v. Epstein-Barr v. bolii Marék Cytomegalovirus Pseudorabie)	I	Ø 100–150	>1 000	IE	ADN	d.c. L	80–120		32–72	162 capsomere; corp central; (ADN) nucleocapsidă; înveliș lipoproteic
Virion nud cu simetrie helicală, genom ADN m.c.	*INOVIRIDAE* (gr. *inos*=mușchi)	*INOVIRUS* fagii filamentoși f1, fd, M13	H	bastonaș flexibil 760–1950 × 6	11–23	N	ADN	m.c. circular	1,5–2,7		42–62	proteina majoră a capsidei (g.m. $\simeq 5 \times 10^3$ dispusă helical + 3–4 proteine de maturare (g.m. $= 65 - 70 \times 10^3$)
Virion nud cu simetrie icozaedrică, genom ARN m.c.	*PICORNAVIRIDAE* (*Pico*-prefix construit artificial pt. a înlocui micro-micro)	*ENTEROVIRUS* Poliovirus uman *RHINOVIRUS* (guturai) *APHTOVIRUS* (febra aftoasă) *CARDIOVIRUS* (encefalomiocardită)	I	Ø 20–30	8–9	N	ARN legat de o proteină 5′ terminal	m.c.	2,5	«+»		12 capsomere (V) cu organizare complexă

Tabelul nr. 12 (continuare)

Caracterizarea	Familia sau grupul	Tipul sau specii mai importante	VIRION				GENOM					Unele caracteristici principale
			Simetria	Mărimea (nm)	g.m.x 10^6 dal	Nud sau învelit	Natura	Tip de structură	g.m.x 10^6 dal	Sens « + » sau « — »	% G+C	
	TYMOVIRIDAE (Tymo=sigla *Turnip yellow mosaic*)	v. mozaicului galben al napului	I	Ø 25	5,6	N	ARN	m.c. L	2	«+»		32 capsomere : 20 (VI) + 12(V)
	LEVIVIRIDAE (l. *levis*= ușor)	Fag MS_2 Fag Qβ	I	Ø 23	3,9	N	ARN	m.c. L	1,1	«+»	51÷52	180 subunități + proteina A pentru maturare
	BROMOVIRIDAE (Bromo=sigla *brom mosaic* de la numele plantei *Bromus*)	*Bromovirus* v. mozaicului obsigei	I I	Ø 25 (3 tipuri diferite de virioni)	4,6	N	ARN	m.c. L segmentat (4 molecule)	1,10(1) 0,90(2) 0,70(3) 0,35(4)	« + »		3 tipuri diferite de particule poliedrice [32 capsomere : 20(VI) + 12(V)] care conțin ARN1, ARN2 și ARN3 + ARN4 ; patogenitatea condiționată de ARN1,2 și 3
	NEPOVIRIDAE (Nepo=sigla *nematode polyedral*)	*V. pătării inelare* la tutun, tomate (transmis de nematode)	I	Ø 30 (3 tipuri diferite de virioni)	3,3(T) 5,7(B)	N	ARN	m.c. L segmentat (2 molecule)	2,4 și 1,4	« + »		3 tipuri de particule poliedrice : fără ARN (T) cu ARN mic (M) sau ARN mare (B). ARN mare este infecțios
Virion nud cu simetrie icozaedrică, genom ARN d.c.	*REOVIRIDAE* (Reo=sigla respiratory enteric orphan	*REOVIRUS* *ORBIVIRUS* *ROTAVIRUS*	I	capsidă dublă Ø extern 80 Ø intern 45	65—200	N	ARN	d.c. L segmentat	12—20 global (0,2—3× 10^6 fiecare)			12 spicule cu simetrie tip 5
	BIRNAVIRIDAE	V. pancreatitei necrozante, la pește Virusul X la Drosophila	I			N	ARN	d.c. L (2 segmente)	2,3 2,5			
Virion cu înveliș extern, simetrie icozaedrică, genom ARN m.c.	*TOGAVIRIDAE*	*ALPHAVIRUS* (Sindbis) *FLAVIVIRUS* V. febrei galbene *RUBIVIRUS* V. rubeolei	I	sferic 40—70		IE	ARN	m.c.	4	« + »		înveliș lipoproteic

Tabelul nr. 12 (continuare)

Caracterizarea	Familia sau grupul	Tipul sau spec 1) mai importante	VIRION: Simetria	VIRION: Mărimea nm	VIRION: g.m. × 10^6 dal	VIRION: Nud sau învelit	GENOM: Natura	GENOM: Tip de structură	GENOM: g.m. × 10^6 dal	GENOM: Sens « + » sau « — »	GENOM: % G+C	Unele caracteristici principale
Virion nud cu simetrie helicală, genom ARN m.c.	*TOBAMOVIRIDAE* (*Tobamo*=sigla tobacco mosaic)	V. mozaicului la tutun (VMT)	H	bastonaş rigid 300 × 18	40	N	ARN	m.c. L	2	« + »		2 200 subunităţi identice
	TOBRAVIRIDAE (Tobra=sigla tobacco rattle)	Tobaccorattle virus	H	2 bastonaşe rigide M (mare) m (mic)	48—50 11—29	N	ARN	m.c. L	ARN1 2,4 ARN2 0,6—1,4 (masă variabilă)	« + »		virus cu 2 componenţi: cel mare (M) 210 × 25 nm, infecţios conţine ARN1. Cel mic (m) lungime variabilă, conţine ARN2; codifică proteina capsidală
	POTYVIRIDAE (Poty=sigla potato Y)	Virusul Y al cartofului V. mozaicului mazării şi fasolei	H	bastonaş flexibil 680—900 × 11		N	ARN	m.c. L	3,0—3,5	« + »		
	POTEXVIRIDAE (Potex=sigla potato X)	Virusul X al cartofului	H	bastonaş flexibil 450—580 × 13	35	N	ARN	m.c. L	2,1	« + »		
Virion cu înveliş extern, simetrie helicală, genom ARN m.c.	*ORTHOMYXOVIRIDAE* (gr.*orthos*=drept, corect; *myxo*=mucus). Influenza, forma italiană de la l. influentia=„epidemic", utilizat pentru că epidemiile erau considerate ca provocate de „influenţe" oculte)	*ORTHOMYXOVIRUS* V. influenza A (v. gripal)	H	Ø 90—120	250	IE	ARN	m.c. L; segmentat (8 molecule diferite)	5 (total)	« — »	41—46	nucleocapsidă: ARN acoperit de subunităţi proteice, simetric helicală Ø 6—9 nm; înveliş lipoproteic cu spicule hemaglutinine (HA) şi neuraminidaze

Tabelul nr. 12 (continuare)

Caracterizarea	Familia sau grupul	Tipul sau specii mai importante	VIRION				GENOM					Unele caracteristici principale
			Simetria	Mărimea nm	g.m.x 10^6 dal	Nud sau învelit	Natura	Tip de structură	g.m.x 10^6 dal	Sens «+» sau «—»	% G+C	
	PARAMYXOVIRIDAE (gr. *para*=alături de)	*PARAMYXOVIRUS* (boala Newcastle *Morbillivirus* (rujeolă) *Pneumovirus* v. respirator sincițial *Sendaivirus*	H	sferic Ø 150	500	IE	ARN	m.c. L	5—7	variabil «+» sau «—» de la un virion la altul)		nucleocapsidă helicală, 1 000 × 12—17 nm; înveliș lipoproteic derivat din membrana celulară; spicule glicoproteice virale
	RHABDOVIRIDAE (gr. *rhabdos*=baston)	*VESICULOVIRUS* V. stomatitei veziculare *LYSSAVIRUS* V. rabic	H	formă cartuș 75×175	300—1000	IE	ARN	m.c. L	4	«—»	?	lipide 15—25% (compoziție variabilă după celula-gazdă)
	RETROVIRIDAE (Retro=sigla *reverse transcriptaza*, l. *retro*=înapoi).	*ONCOVIRUS TIP C* (*Oncornavirus*) V. sarcomului aviar (Rous) V. leucozei aviare	H	Ø 80—100		IE	ARN 2 molecule + molecule mici adiționale	m.c. L	3	«+»		2 nucleocapside helicale/virion, care protejează două molecule identice de ARN; înveliș lipoproteic; transcriptaza inversă
	BUNYAVIRIDAE (Bunyamvera localitate din Uganda unde a fost izolat)	*Bunyamveravirus* V. encefalitei umane (transmise de țînțar)	H	sferic ovalar Ø 90—100		IE	ARN	m.c. segmentat 3 fragmente L, M, S (mare, mijlociu și mic)	4			nucleocapsidă helicală, include ARN; Ø 2,5 nm, lungime 0,2—3 μm, uneori superhelicală, spicule glicoproteice

Caracterizarea	Familia sau grupul	Tipul sau specii mai importante	GENOM				VIRION					Unele caracteristice principale
			Simetria	Mărimea nm	g.m.x 10^6 dal	Nud sau învelit	Natura	Tip de structură	g.m.x 10^6 dal	Sens « + » sau « — »	% G+C	
	ARENAVIRIDAE (l. *arenosus*=nisipos, după aspectul la microscop electronic)	*Arenavirus*	H	pleomorf 50–300	300–400	IE	ARN	m.c. segmentat (5 molecule: 2 specific virale + 3 din celula-gazdă)	?			
	CORONAVIRIDAE (l. *corona* = coroană, după aspectul spiculelor la microscop electronic)	*Coronavirus* V. bronşitei aviare	H	75–160	?	IE	ARN	m.c.	5,5			sferic; înveliş cu spicule bulboase, spaţiate regulat, foarte lungi
Virion cu simetrie combinată (icoza-edrică+helicală), genom ADN d.c.	*UROPHAGES* (gr. *myos*= muşchi; coadă contractilă)	*MYOVIRIDAE* (T-par *E. coli*)	I cap H coadă	100 100	210	N	ADN	d.c. L permutat circular şi redundant	130		36	coadă complexă contractilă (gît, cilindru axial, teaca cozii, placă bazală, croşete, fibre)
	(gr. *stylos*= coloană, coadă necontractilă)	*STYLOVIRIDAE* (λ *E. coli*)	I H	60 160	60	N	ADN	d.c. L extremităţi adezive	32		51	coadă flexibilă necontractilă
	(l. *pes.*=*pedis*=picior, coadă scurtă)	*PEDOVIRIDAE* (T7 *E. coli*)	I cap H coadă scurtă	65 17	47	N	ADN	d.c. L	25		50	coadă scurtă (17 nm) cu 6 fibre scurte
Virion cu organizare complexă şi înveliş extern, genom ADN d.c.	*POXVIRIDAE* (engl. veche pock= pustulă, ulceraţie)	*ORTHOPOXVIRUS* V. vaccinei *Parapoxvirus* *AVIPOXVIRUS* *CAPRIPOXVIRUS* *LEPORIPOXVIRUS* (myxom) *ENTOMOPOXVIRUS*	H	ovoidă sau „cărămidă" 170–250 × 300–320		IE	ADN	d.c.	130–240		35–40	arhitectură complexă: nucleocapsidă helicală, corpi laterali ovoizi; > 30 proteine structurale; enzime; lipide 4 %, glucide 3 %

Bibliografie selectivă

Bablanian, R. 1972 — *Mechanisms of virus cytopathic effects.* În: *Symposium Society General Microbiology.* Microbial pathogenicity in man and animals, Cambridge Press, Londra, 22, 359—381.

Bablanian, R. 1975 — *Structural and functional alterations in cultured cells infected with cytocidal viruses.* Progr. Med. Virol., 19, 40—83.

Baglioni, C., Nilsen, T. W. 1981 — *The action of interferon at the molecular level.* Amer. Sci., 69, 392—399.

Baltimore, D. 1971 — *Expression of animal virus genomes.* Bacteriol. Rev., 35, 235—242.

Baltimore, D. 1976 — *Viruses, polymerases and cancer.* Science, 192, 632—636.

Bocci, V. 1981 — *Production and role of interferon in physiological conditions.* Biol. Rev., 56, 49—85.

Bradley, E. D. 1967 — *Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins.* Bacteriol. Rev., 31, 230—314.

Burke, C. D. 1977 — *The Status of Interferon.* Sci. Amer., 236, 42—50.

Burnet, F. M. 1979 — *Portraits of viruses Influenza virus A.* Intervirology, 11, 201—214.

Butler, P.J.G., Klug, A. 1978 — *The Assembly of a Virus.* Sci. Amer., 239, 52—59.

Casjens, S., King, J. 1975 — *Virus assembly.* Ann. Rev. Biochem., 44, 555—611.

Caspar, D.L.D., Klug, A. 1962 — *Physical principles in the construction of regular viruses.* În: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 27, 1—24.

Choppin, P. W., Scheid, A. 1980 — *The role of viral glycoproteins.* În: *Adsorbtion, Penetration and Pathogenicity of viruses.* Rev. of Inf. Dis., 2, 40—61.

Civerolo, E. L. 1977 — *Microbial viruses: physical-chemical properties and modes of replication.* Symp. Agr. Res., 135—157.

Crawford, L. V. 1980 — *Transforming Genes of DNA Tumor Viruses.* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XLIV, 9—11.

Crowther, R. A. 1971 — *Three-dimensional reconstruction and the architecture of spherical viruses.* Endeavour, 111, 124—129.

Dales, S. 1973 — *Early events in cell-animal virus interactions.* Bacteriol. Rev., 37, 103—135.

Diener, T. O. 1974 — *Viroids: the smallest Known Agents of infectious disease.* Ann. Rev. Microbiol., 28, 23—39.

Diener, T. O. 1974 — *Viroids as Prototypes or degeneration Products of Viruses.* În: *Viruses, Evolution and cancer.* Academic Pres, New York, p. 757—783.

Diener, T. O. 1979 — *Viroids: structure and function.* Science, 205, 859—866.

Diener, T. O., Owens, R. A. 1980 — *Viroids.* Progr. Mol. Subcellular Biol., 7, 235—252.

Diener, T. O. 1981 — *Viroids: abnormal products of plant metabolism.* Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 313—325.

Echols, H. 1972 — *Developmental pathways for the temperate phage: lysis VS lysogeny.* Ann. Rev. Genetics, 6, 157—190.

Echols, H. 1979 — *Bacteriophage and bacteria: Friend and Foe.* În: *The Bacteria,* vol. VII, p. 487—515, Academic Press. Inc., New York,

Eiseeling, A. F., Dickson, R. C. 1972 — *Assembly of viruses.* Ann. Rev. Biochem., 41, 467—495.

Fenner, F. 1973 — *The Evolution of Viruses.* Search, 4, 477—485.

Fenner, F., McAuslan, B. R., White D. O., Mims, C. A. Sambrook, J. 1974 — *The Biology of Animal Viruses.* Acad. Press Inc., New York, Londra.

FENNER, F. 1976 — *Clasification and nomenclature of viruses.* Second Report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. Intervirology, 7, 1—115.
FULTON, R. W. 1980 — *Biological significance of multicomponent viruses.* Ann. Rev. Phytopath., 18, 131—146.
FÜNFTE, A.B.V., H. J. GROSS, 1980 — *Viroide, eine neue klasse infektiöser nucleinsäuren.* Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 361, 477—492.
GILLESPIE, D., GALLO, R. C. 1975 — *RNA processing and RNA Tumor Viruses Origin and Evolution.* Science, 188, 802—811.
GROSS, H. J., RIESNER, D., 1980 — *Viroids : a class of subviral pathogens.* Angewandte Chemie, 19, 231—332.
HAMILTON, R. I. 1974 — *Replication of Plant Viruses.* Ann. Rev. Phytopath., 12, 223—245.
HANNOUN, C. (ed.) 1976 — *Les Virus.* Cours de l'Institut Pasteur. Ediscience McGraw-Hill, Paris.
HARRISON, S. C. 1981 — *Molecular Organization of Virus Particles : Implications for Assembly.* În : *Bacteriophage Assembly,* p. 3—18. Alan Liss Inc., New York.
HAYES, W. 1980 — *Portraits of viruses : Bacteriophage Lambda.* Intervirology, 13, 133—150.
HIRTH, L., RICHARDS, K. E. 1981 — *Tobacco Mosaic Virus : model for structure and function of a simple virus.* Adv. Virus. Rev., 26, 145—199.
HORNE, R. W. 1978 — *Structure and Function of Viruses.* Edw. Arnold Ltd., Londra.
HOWE, C., COWARD, J. E., FENGER, T. W. 1980 — *Viral Invasion : Morphological, Biochemical and Biophysical Aspects.* În : *Comprehensive Virology,* vol. 16, H. Fraenkel-Conrat (ed). Plenum, Publ. Corp., p. 1—71.
HUANG, A. S. 1977 — *Viral pathogenesis and molecular biology.* Bacteriol Rev., 41, 811—821.
JACOB, F. 1970 — *La logique du vivant. Une histoire de l'hérédité.* Gallimard, Paris.
JASPAR, E.M.J. 1974 — *Plant viruses with a multipartite genome.* Adv. Virus. Res., 19, 37—149.
JOKLIK, W. K. ZWEERINK, H. J. 1971 — *The morphogenesis of animal viruses.* Ann. Rev. Genetics, 5, 297—360.
JOKLIK, W. K. 1974 — *Evolution in viruses.* În : Symposium Society General Microbiology, Cambridge Press, Londra, 24, 293—320.
JOKLIK, W. K. 1977 — *The mecanism of action of interferon.* Ann. of the N. Y. Acad. of Sci., 284, 711—716.
VAN KAMMEN, A. 1972 — *Plant Viruses with a divided genome.* Ann. Rev. Phytopath., 10, 125—150.
KAPER, J. M. 1975 — *The chemical Basis of Virus. Structure, Dissociation and Reassembly,* North Holland, Publ. Co., Elsevier, Amsterdam.
KELLENBERGER, E. 1980 — *Molecular mechanisms controlling protein-protein and protein-nucleic acid interactions is reveled by studies of virus maturation.* Experientia, 36, 267—276.
KLEINSCHMIDT, A. K. 1969—*Chromosomes of viruses.* În : *Handbook of Molecular Cytology.* North Holland Publ. Co. American, Elsevier Amsterdam.
KLEINSCHMIDT, A. K., KLOTZ, G., SELIGER, H. 1981 — *Viroid structure.* Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10, 115—132.
KLENK, H. D. 1974 — *Viral Envelopes and their Relationship to Cellular Membranes.* În : Current Topics Microbiology Immunol., 68, 29—59.
LEBEURIER, G., HIRTH, L. 1975 — *Le virus de la mosaique du Tabac: un modèle de morphologie virale in vitro.* Bull. Inst. Pasteur, 73, 141—165.
LONBERG, HOLM, PHILIPSON, L. 1974 — *Early Interactions between Animal Viruses and Cells.* Seria „Monographs in Virology". S. Karger, Basel.
LUFTIG R. B. 1981 — *Strategies in Phage and Animal Virus Morphogenesis.* În : *Bacteriophage Assembly,* Alan Liss Inc., New York, p. 517—545.
LURIA, S. E., DARNELL, J. E. 1967 — *General Virology.* Wiley, New York.
LURIA, S. E. 1973 — *Life, the unfinished Experiment.* Charles Scribner's Sons, New York.
LWOFF, A. 1957 — *The Concept of Virus.* J. Gen. Microbiol., 17, 239.
LWOFF, A. 1969 — *L'ordre biologique.* Robert Laffont, Paris.
LWOFF, A. 1981 — *Introduction V-e Congrès International de Virologie (IAMS).* Annales de Virologie., 132 E, 121—134.
MAHY, B.W.J., BARRY, R. D. 1975 — *Negative Strand Viruses,* vol. I, II, Acad. Press, New York.
MARVIN, D. A. WACHTEL, E. J., 1976—*Structure and assembly of filamentous bacterial viruses.* Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B, 276, 81—98.
MATTERN, C.F.T. 1977 — *Symmetry in Virus Architecture.* În Molecular Biology of Animal Viruses, vol. *1,* D. P. NAYAK ed., M. Decker, New York.

McAuslan, B. R. 1975 — *Viruses — associated enzymes.* Life Sciences, 14, 2 085—2 097.
Melnick, J. L. 1979 — *Taxonomy of viruses.* Progr. Med. Viral., 25, 160—165.
Meurs, A. 1980 — *L'interferon: données récentes sur sa biosynthèse et son action biochimique.* Bull. Inst. Pasteur, 78, 175—212.
Monto, Ho., Armstrong, J. A. 1975 — *Interferon.* Ann. Rev. Microbiol., 29, 131—161.
Nahmias, A. J., Reanney, D. C. 1977 — *The Evolution of viruses.* Ann. Rev. Ecol. Syst., 8, 29—49.
Nayak, D. P. (ed.) 1978 — *The molecular Biology of Animal Viruses,* vol. I, II, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
Newton, A. A. 1970 — The requirements of a virus. În : *Organization and Control in prokaryotic and eukaryotic cells,* Symposium Society General Microbiology, Univ. Press., Cambridge, Londra 20, 323—358.
Pillot, J. 1979 — *Le virus de l'hépatite B: particularité de sa structure et du mécanisme des lésions.* Bull. Inst. Pasteur, 77, 161—195.
Pop, I. V. 1975 — *Virusurile și virozele plantelor,* Edit. Ceres, București.
Poste, G., Nicolson, G. K. (ed.) 1977 — *Virus infection and the cell surface,* North Holland Publ. Co. Elsevier, Amsterdam.
Rapp, F., Westmoreland, D. 1976 — *Cell transformation by DNA-containing viruses.* Biochimica, biophysica Acta, 458, 167—211.
Reanney, D. C. 1974 — *Viruses and evolution.* Int. Rev. Cytology, 37, 21—52.
Semancik, J. S. 1979 — *Small pathogenic RNA in Plants. The Viroids.* Ann. Rev. Phytopathol., 17, 461—484.
Shatkin, A. J. 1974 — *Animal RNA Viruses: genome structure and function.* Ann. Rev. Biochem., 43, 643—665.
Showe, M. H., Kellenberger, I. 1975 — *Control mechanisms in virus assembly.* Symposium. Society, General. Microbiology, 25, 407—438.
Stewart II, W. E. 1979 — *The Interferon system,* Springer Verlag, Viena, New York.
Streissle, G. 1981 — *Persistent viral infections as models for research in virus chemotherapy.* Adv. Virus. Res., 26, 37—61.
Temin, H. M. 1971 — *Mechanism of cell transformation by RNA tumor viruses.* Ann. Rev. Microbiol., 25, 610—647.
Temin, H. M. 1974 — *From Proviruses to Protoviruses: RNA-Directed DNA Synthesis by RNA Tumor Viruses and Cells. Molecular Studies,* în : *Viral Neoplasia,* 7—38.
Temin, H. M. 1974 — *On the origin of RNA tumor viruses.* Ann. Rev. Genetics, 8, 155—177.
Temin, H. M. 1976 — *The DNA provirus hypothesis.* Science, 192, 1 075—1 080.
Temin, H. M. 1980 — *Origin of Retroviruses from Cellular Moveable Genetic Elements.* Cell, 21, 599—600.
Temin, H. M. 1980 — *Viral oncogenes.* In : Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XLIV, 1—7.
Todaro, G. J., Callahan, R., Rapp, U. R., Delarco, J. E. 1980 — *Genetic transmission of retroviral genes and cellular oncogenes.* Proc. Roy. Soc. Lond. B 210, 367—385.
Tonn, S. J. Gander, J. E. 1979 — *Biosynthesis of polysaecharides by prokaryotes.* Ann. Rev. Microbiol., 33, 169—199.
Tovey, M. G. 1980 — *Viral Latency and its importance in human disease.* Path. Biol., 26, 631—634.
Troy II, F. A. 1979 — *The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers.* Ann. Rev. Microbiol., 33, 519—560.
Van der Werf, S., Girard, M. 1980 — *Replication et expression génétique des adénovirus.* Bull. Inst. Pasteur, 78, 49—102.
Wood, H. A. 1973 — *Viruses with double-stranded RNA Genomes.* J. Gen. Virology, 20, 61—85.
Wrigley, N. G. 1979 — *Electron Microscopy of Influenza Virus.* Brit. Med. Bull., 35, 35—38.
Zaitlin, M. 1977 — *Replication of plant viruses-an overview.* Symp. Agr. Res. 33—46.
Zarnea, G. 1970 — *Microbiologie generală.* Edit. didactică Pedagogică, București.
Zarnea, G., Herlea, V. 1974 — *Poziția microorganismelor în lumea vie. Conceptul de virus — Conceptul de bacterie.* Progrese și perspective în biologie, 19—87.
Zhdanov, V. M. Tikhonenko, T. I. 1974 — *Viruses as a factor of evolution exchange of genetic information in the biosphere.* Adv. Virus. Res., 19, 361—395.
Zinder, N. D. 1980 — *Portraits of viruses: RNA phage.* Intervirology, 13, 257—270.

ANATOMIE BACTERIANĂ

Conceptul de bacterie

Deşi primele bacterii au fost evidenţiate şi descrise de către A. van Leeuwenhoek (1675), recunoaşterea lor ca grup distinct a fost făcută abia în perioada 1850—1875 de către Cohn, pe baza proprietăţilor grupului omogen al eubacteriilor*).

Ulterior, descoperirea diferitelor grupuri de bacterii (actinomicete, spirochete, mixobacterii etc.) a complicat mult situaţia, scoţînd în evidenţă multe caractere care nu sînt unitare. De exemplu, au fost descrise bacterii imobile sau mobile prin unul sau mai mulţi flageli, alunecare, tîrîre sau prin contracţia unui filament axial. S-a evidenţiat că multiplicarea se poate face prin diviziune, înmugurire sau formare de celule specializate (spori), sau prin segmentare şi fragmentare la actinomicete. Unele bacterii, ca actinomicetele, prezintă, datorită structurii lor miceliene, analogii frapante cu grupul fungilor în care au fost încadrate multă vreme, iar altele, ca mixobacteriile, prezintă un ciclu de dezvoltare complex, care include un stadiu de creştere vegetativă şi unul de fructificaţii policelulare, adesea cu dimensiuni macroscopice — ca protistele amoeboide.

Conceptul de bacterie a fost definit abia în perioada 1960—1964, oferind posibilitatea de a grupa pe criterii obiectiv-ştiinţifice, discriminatorii, microorganismele reunite pînă atunci numai pe bază de acord pur convenţional.

Stanier (1962, 1964, 1967) are meritul de a fi demonstrat primul că diversificarea prin evoluţie a lumii bacteriene are la bază un caracter comun — celula procariotă — şi că această diversitate poate fi descrisă sub forma unor variaţii pe această unică temă — destul de simplă — mai ales sub raport structural. De aceea, conceptul de bacterie, în forma sa actuală, trebuie şi nu poate fi definit decît în funcţie de această organizare procariotă şi prin antiteză cu tipul de organizare a celulei eucariote.

Celula procariotă, mai puţin complexă, este unitatea de structură a bacteriilor *sensu lato* şi a „algelor” albastre-verzi. *Celula eucariotă*, mai

---

*) Stanier şi Lwoff (1973) consideră că F. Cohn este adevăratul fondator al bacteriologiei ca ramură specializată a biologiei.

complexă, este unitatea de structură a tuturor celulelor animale, a plantelor vasculare, a briofitelor, a fungilor şi a tuturor celorlalte grupuri de alge (fig. 118, 119). Divergenţa fundamentală care separă bacteriile şi „algele'' albastre-verzi de toate celelalte organisme, corespunzînd diferenţei dintre tipul procariot şi eucariot, reprezintă cea mai mare disconti-

Fig. 118. — Reprezentarea schematică a unei celule animale. ADNM — ADN mitocondrial; AG — aparat Golgi; BT — bară terminală; C — cil; CB — corpuscul bazal; CHR — filamente cromosomale; CI — canalicul intercelular; CL — centriol; CLS — citolisom; CM — creste mitocondriale; C(M) — cil (secţiune mărită); CMV — corp multivezicular; CP — citoplasmă; CPC — canal de pinocitoză; CR — corp rezidual; CS — centrosom; D — desmosom; DS — dictiosom; ERG — reticul endoplasmic granular (ergastoplasmă); FM — figuri mielinice; FSC — fibre secundare ale cililor; GG — granule de glicogen; GPZ — granulă de prezimogen; GZ — granulă de zimogen; I — interdigitaţii; L — lizosom; M — mitocondrie; MB — membrană bazală; M(M) — mitocondrie (porţiune mărită puternic); MN — membrană nucleară; MP — membrană plasmatică; MP(M) — membrană plasmatică (porţiune mărită puternic); MT — microtubul; MV — microvil; N — nucleu; NL — nucleol; PE — particule elementare; PH — fagosom; PL — picătură lipidică; PN — por nuclear; POS — peroxisom; PR — poliribosom; PS — margine în perie; R — ribosomi; RC — rădăcinile cililor; REA — reticul endoplasmic agranular; S — siderosom; SI — spaţiu intercelular; SPN — spaţiu perinuclear; TCC — tubuli ciliari centrali; TCL — tubuli ciliari laterali; TF — tonofilamente; V — vezicule; VD — vacuolă digestivă; VE — veziculă de eliminare; VG — vacuole golgiene; VP — vezicule de pinocitoză; VPH — vacuolă de fagocitoză.

nuitate evolutivă unică prezentă azi în lumea vie. Nu se cunosc intermediari între procariote şi eucariote, adică nu se cunosc organisme cu o structură celulară de tranziţie. Dodge (1965 ,1971), pornind de la observaţia că dinoflagelatele au unele caracteristici ale procariotelor şi altele

aparţinînd eucariotelor propune includerea lor într-un grup intermediar *Mesokaryota*.

Cercetările de microscopie electronică şi cele de biologie moleculară au dezvăluit şi accentuat discontinuitatea dintre procariote şi eucariote şi au dus la acumularea unui număr important de caractere discriminatorii,

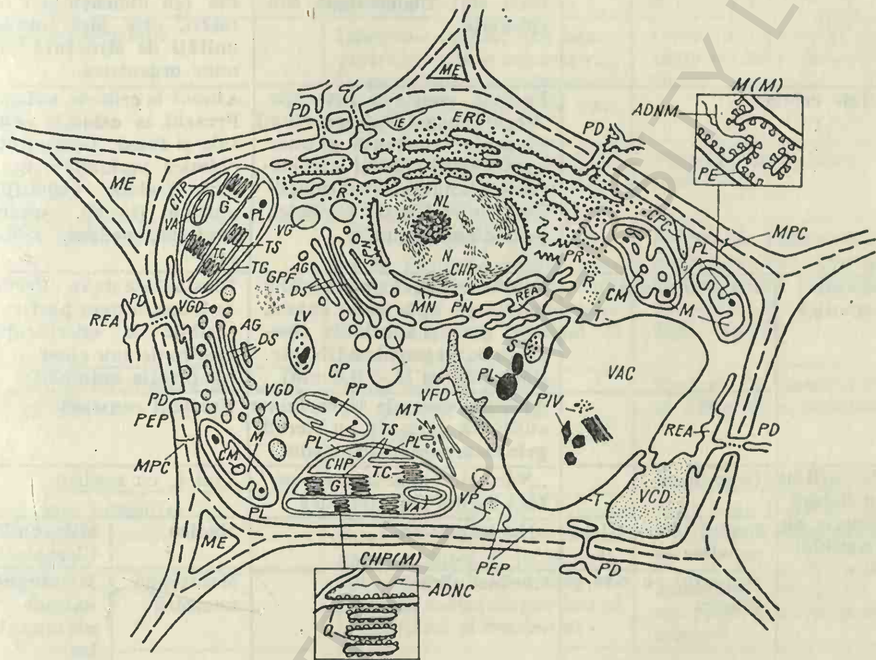


Fig. 119. — Reprezentarea schematică a unei celule vegetale. ADNC—ADN în cloroplaste; ADNM — ADN mitocondrial; AG — aparat Golgi; CHP — cloroplast; CHP(M) — porţiune din cloroplast mărită puternic; CHR — filamente cromosomale; CM — creste mitocondriale; CP — citoplasmă; DS — dictiosom; ERG — reticul endoplasmic granular; G — granum; CPF — granulă de fitoferitină; IE — invaginare ectoplasmică; LV — lizosom (sferosom); ME — meat; MIT — mitocondrie; M(M) — mitocondrie (mărită puternic); MN — membrană nucleară; MPC — membrană pectocelulozică; MT — microtubuli; N — nucleu; NL — nucleol; PE — particulă elementară; PEP — peliculă ectoplasmică (obişnuit lipită de membrana pectocelulozică, uneori formînd invaginări); PIV — precipitat intravacuolar; PD — plasmodesmă; PN — por nuclear; PP — protoplast; PR — poliribosomi; Q — cuantosom; R — ribosomi; REA — reticul endoplasmic agranular; SP — spaţiu perinuclear; T — tonoplast; TC — tilacoid; TS — tilacoid integranar (stromatic); VA — vacuolă amiliferă; VAC — vacuolă; VCD — vacuolă cu conţinut dens; VFD — vacuolă cu conţinut dens pe cale de formare; VG — vacuolă golgiană; VGD — vacuolă golgiană cu conţinut dens; VP — vacuolă de pinocitoză.

care permit să se stabilească ceea ce este realmente tipic şi ceea ce este numai aparent şi superficial similar, pentru încadrarea pe baze ştiinţifice a diferitelor entităţi într-un grup sau altul (tabelul nr. 13).

Tabelul nr. 13

Caracterele diferenţiale ale celulelor procariote şi eucariote

		Celula procariotă *Bacteria* *Cyanobacteria*	Celula eucariotă *Algae. Fungi. Protozoa. Plantae. Animalia.*	
Dimensiuni		Microorganisme. Cele mai mari sint filamentoase sau spiralate	Unele sint microorganisme (cu dimensiuni mai mari), cele mai multe, unităţi de structură ale unor organisme	
Peretele celular		Prezent constant (excepţie *Mycoplasma* şi *Halobacterium*) Prezenţa constantă a unor constituenţi chimici caracteristici: mureină (peptidoglican), uneori acizi teichoici, acid diaminopimelic	Absent la celulele animale. Prezent la celulele vegetale şi fungi. Compoziţie chimică variabilă: celuloză (celula vegetală), chitină (fungi), uneori proteine, polioze, siliciu etc.	
Membrana plasmatică	Permeabilitate	Foarte selectivă (permeabilă numai pt apă, unii anioni, acizi graşi şi substanţe liposolubile, fragmente ADN etc. (molecule cu Ø < 0,8 nm)	Plasticitate mare. Permite trecerea unor particule vizibile la microscopul electronic sau chiar fotonic (celula animală)	
	Steroli	Absenţi: excepţie *Mycoplasma* cultivată pe medii cu steroli, prin încorporarea din mediu	Prezenţi constant	
Partcularităţi de structură şi funcţie ale materialului genetic	Organizare	„Nucleoid" sau "nucleosom", fără formă caracteristică	Tipică, cu nucleol	
	Sediul informaţiei genetice	Nucleoplasmă	Nucleu	Mitocondrii Cloroplaste
	Raportul cu citoplasma	Contact direct	Membrană nucleară	Membranele externe ale organitelor
	Structură moleculară	Cromosom bacterian (ADN. d.c. circular închis covalent); accesoriu plasmide (unităţi genetice extracromosomale)	Număr constant (caracteristic de specie) de cromosomi (ADN + histone)	ADN d.c. circular
	Mecanismul replicării	Simplu, semiconservativ	Mitoză	Ca la procariote
	Sediul traducerii mesajului genetic	Citoplasmă Ribosomi 70S	Citoplasmă Ribosomi 80S	Organite Ribosomi 70S
Citoplasma		Gel permanent—menţine structurile (materialul nuclear) în lipsa membranelor interne. Absenţa curenţilor citoplasmatici	Transformări reversibile: sol ⇄ gel. Prezenţa curenţilor citoplasmatici	
Mitocondrii		Absente	Prezente	
Cloroplaste		Absente. Înlocuite de structuri simple derivate din membrana plasmatică	Prezente (la cele capabile de fotosinteză)	

Tabelul nr. 13 (continuare)

	Celula procariotă *Bacteria* *Cyanobacteria*	*Celula eucariotă* *Algae Fungi. Protozoa.* *Plantae. Animalia.*
Motilitate	Flageli (facultativ); structură simplă caracteristică de tip procariot (filament de flagelină + motor rotativ)	Cili sau flageli (facultativ) de tip eucariot (structură complexă caracteristică, 2 × 9 + 2)
Tipul de diviziune	Diviziune simplă. Rar înmugurire (diviziune asimetrică), fragmentare sau segmentare (diviziune multiplă) la bacteriile filamentoase	Diviziune indirectă (mitoză) cu faze caracteristice
	Absența aparatului mitotic. Echipartiția materialului genetic, asigurată de mezosom	Prezența aparatului mitotic
Procese de sexualitate	Absente. Excepțional procese de protosexualitate (parasexualitate): transfer unidirecțional ♂ → ♀, cu formare de merozigoți (parțial și temporar diploid)	Frecvențe. Formarea gameților haploizi precedată de meioză (diviziune reducțională) Zigot diploid
Mecanisme de transfer al materialului genetic	Transformare genetică Transducție genetică Conjugare Sexducție Transfecție	Fuziune de gameți urmată de fuziune nucleară
Sinergonul fotosintezei	Interrelate funcțional și structural. Localizate în membrana plasmatică și în diverticulii ei. Celula ca întreg reprezintă sediul ireductibil al fotosintezei și respirației	Autonom. Localizat în structuri specifice (cloroplaste)
Sinergonul respirației		Autonom. Localizat în structuri specifice (mitocondrii)
Echipamentul enzimatic oxidativ și de fotosinteză	„Neîmpachetat" în structuri specifice. Legat de membrana plasmatică și de diverticulii ei (cromatofori, vezicule, lamele de fotosinteză)	„Împachetat" în structuri specifice (mitocondrii și cloroplaste)
Capacitate de endo- și exocitoză	Absentă	Prezente: pinocitoză, endocitoză, exocitoză
Infecție virală prin fagocitarea virionului	Imposibilă	Prezentă (celula vegetală numai după lezarea peretelui celular)
Capacitate de digestie intracelulară (intravacuolară) după fagocitoză sau pinocitoză, prin lizosomi	Absentă	Prezentă
Secreția substanțelor dizolvate sau a microstructurilor prin exocitoza vacuolelor formate de aparatul Golgi	Absentă	Prezentă
Funcții datorate sistemelor microtubulare (asamblare aparat mitotic, locomoție ciliară etc.)	Absentă	Prezentă

Tabelul nr. 13 (continuare)

			Celula procariotă Bacteria Cyanobacteria	Celula eucariotă Algae. Fungi. Protozoa. Plantae. Animalia.
Sensibilitate la agenţi cu toxicitate selectivă, activi pe anumite structuri celulare „ţintă”	Agenţi	Ţintă		
	Penicilină Bacitracină Cicloserină	Biosinteza peptidoglicanilor	Prezentă	Absentă
	Vinblastină Colchicină	Asamblarea microtubulilor	Absentă	Prezentă
	Cloramfenicol Streptomicină Tetracicline Macrolide	Ribosomi 70S	Prezentă	Absentă*)
	Cicloheximide	Ribosomi 80S	Absentă	Prezentă
	Antibiotice polienice Micostatine	Sterolii membranei plasmatice	Absentă	Prezentă
Capacitate de a forma organisme multicelulare			Absentă. Sînt organisme unicelulare solitare sau coloniale	Formează frecvent organisme multicelulare
Capacitate de diferenţiere celulară			Foarte rară şi limitată	Prezentă

*) Pot perturba ribosomii din mitocondrii şi cloroplaste, dar în celula normală aceştia sînt inaccesibili.

Poziţia microorganismelor în lumea vie

Cele mai multe dintre caracterele prezentate în tabelul nr. 13 prezintă diferenţele fundamentale (caractere discriminatorii) între bacterii şi celula vegetală (ca prototip de celulă eucariotă), demonstrînd astfel — fără echivoc — absenţa oricărei punţi de legătură între lumea bacteriană şi cea a plantelor.

De aceea, încadrarea bacteriilor în rîndul plantelor este arbitrară şi nelogică (Stanier şi Van Niel, 1962, 1977), menţinerea ei de-a lungul anilor reprezentînd rezultatul „refuzului îndărătnic de a privi lucrurile în faţă”, singurul argument care poate fi invocat fiind acela al aprecierii preştiinţifice, după care în lumea vie ar exista doar două categorii de organisme — mutual exclusive — plantele şi animalele (fig. 120).

Pe măsură ce lumea microscopică a fost cunoscută mai aprofundat a devenit evident că unele microorganisme nu pot fi clasate — fără rezerve — în nici unul dintre cele două regnuri tradiţionale şi că există grupuri întregi — cu caractere intermediare — revendicate în egală măsură şi de botanişti şi de zoologi (de ex., *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Volvox* etc.).

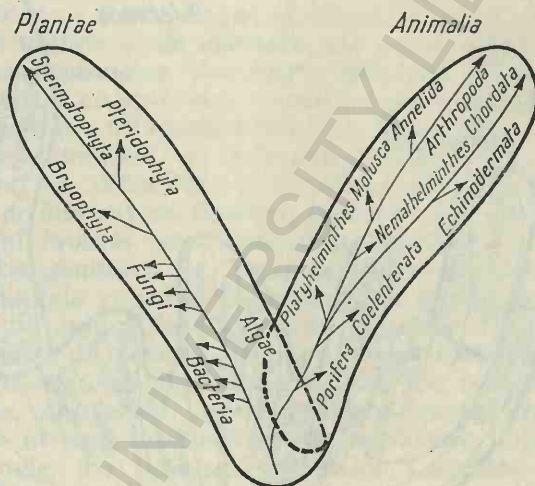


Fig. 120. — Schemă simplificată a sistemului de clasificare bazat pe două regnuri.

Inconvenientele majore ale sistemului tradiţional de clasificare au fost sesizate iniţial de Hogg (1860) care a propus gruparea microorganismelor într-un regn nou, regnul *Primigenum*, denumit ulterior *Protoctista.*

Cîţiva ani mai tîrziu, Haeckel (1866) propune crearea unui regn menit să grupeze toate formele inferioare de viaţă, regnul *Protista*, definit şi delimitat în mai multe variante, pentru ca în formele sale finale (1894 — 1904) să includă numai microorganismele unicelulare sau unicelular-coloniale. Puţin acceptată de biologi, această concepţie a evoluat sub forma a diferite variante, care au păstrat însă drept criteriu de clasificare nivelul de organizare biologică.

Ţinînd seama de acest criteriu, Stanier (1970) împarte regnul *Protista* în două subgrupuri — al protistelor inferioare, corespunzînd microorganismelor procariote (bacterii şi „alge" albastre-verzi), şi al protistelor superioare, corespunzînd microorganismelor eucariote, care includ algele, fungii şi protozoarele. În această accepţiune, cadrul conceptului de *Protista* este extins la toate organismele unicelulare, cenocitice sau multicelulare care nu formează ţesuturi.

Regnul *Protista* include în acest mod toate microorganismele, dar în acelaşi timp şi un anumit număr de macroorganisme, fie cenocitice, fie pluricelulare, dar nediferenţiate, cum sînt spre exemplu algele marine mari, bazidiomicetele etc.

Sistemul celor 4 regnuri propus de Copeland (1938) şi modificat de Hutchinson (1967) şi Weisz (1971) are ca trăsătură esenţială diviziunea lumii microorganismelor în patru regnuri (fig. 121):

1) *Monera (Mychota)*, care include bacteriile propriu-zise şi „algele" albastre-verzi;

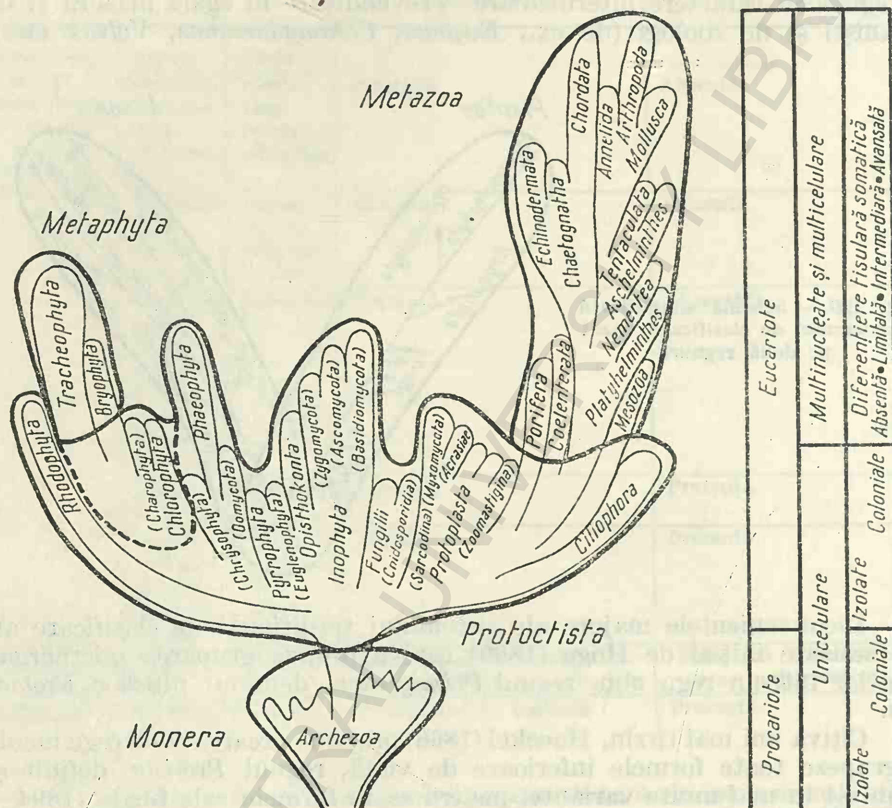


Fig. 121. — Sistemul lui Copeland de clasificare a lumii vii, cu nivele de organizare corespunzătoare.

2) *Protoctista*, incluzînd organisme eucariote inferioare cu organizare unicelulară, unicelular-colonială, sinciţială sau multicelulară, fără diferenţiere celulară avansată (de ex., algele cu excepţia celor procariote, fungii, mixomicetele şi protozoarele).

Restul organismelor vii sînt împărţite între cele două regnuri clasice:

3) *Plantae (Metaphyta*, Weisz) — corespunzînd plantelor terestre şi acvatice — organisme eucariote superioare, multicelulare, cu perete celular şi diferenţiere celulară variabilă de la limitată la intermediară.

4) *Animalia (Metazoa*, Weisz) — incluzînd organisme multicelulare eucariote, conţinînd celule fără perete celular şi fără plastide, avînd (cele mai multe) cavităţi digestive interne şi prezentînd o diferenţiere avansată, celulară, tisulară şi de organe.

Deși are o serie de avantaje mari față de sistemele anterioare și reprezintă o contribuție majoră la interpretarea lumii vii, sistemul celor patru regnuri, în diferitele sale variante, prezintă o serie de imperfecțiuni, care, deși sînt proprii lumii vii ca obiect de clasificare, apar cu evidență maximă, legate tot de lumea organismelor simple.

Între aceste imperfecțiuni sînt de menționat următoarele:

Regnul *Protoctista (Protista)*, foarte bogat și diferit în raport cu grupul moneric, este lipsit de unitate și de claritate, din cauza faptului că limitele de organizare ale organismelor sînt foarte largi, iar diferențierea lui de organismele superioare nu este clar trasată. Această situație se datorează faptului că, în realitate, nu există nici o cale bună pentru a separa organismele eucariote inferioare de cele superioare, ci numai diferite alternative de opțiune, cu dificultăți și inconveniente diferite. Luînd drept criteriu nivelul de diferențiere tisulară, apartenența algelor și a fungilor superiori la regnul *Protista* este o consecință imediată, care atrage după sine o a doua, eterogenitatea lui. Linia de demarcație între *Protista*, pe de o parte, și plantele și animalele superioare, pe de alta, este trasată, în primul rînd, de gradul de diferențiere tisulară, situație care creează o delimitare destul de neclară. În fapt, regnul *Protoctista* reprezintă mai curînd o confederație de organisme excluse din celelalte trei regnuri (*Monera*, *Plantae*, *Animalia*), care cuprinde o foarte largă gamă de organisme cu diferite niveluri intermediare de organizare, superioare în raport cu procariotele, dar inferioare plantelor vasculare și animalelor superioare.

Sistemul celor cinci regnuri, propus de Whittaker (1969), încearcă să ocolească deficiențele sistemelor precedente, utilizînd următoarele criterii de grupare (fig. 122):

1) Stabilirea a trei niveluri de organizare: a) procariot; b) eucariot unicelular; c) eucariot multicelular — multinuclear;

2) Existența a trei modalități principale de nutriție, determinante a trei direcții majore de evoluție, care la nivelul multicelular (multinuclear) se exprimă prin divergențele evolutive ale celor trei regnuri superioare: a) nutriția fotosintetică (secundar absorbtivă) — caracteristică plantelor; b) nutriția ingestivă — tipică pentru animale și c) nutriția absorbtivă — caracteristică fungilor.

Consecințele adoptării acestor criterii sînt în esență — pe lîngă unele restructurări ale grupelor mai mici — următoarele: 1, apariția regnului *Fungi* ca al treilea regn de organisme superioare, alături de plante și animale; 2, trecerea algelor verzi în regnul *Plantae*, alături de plantele verzi superioare; 3, plasarea liniei de demarcație dintre organismele superioare și protiste la trecerea de la unicelular la multicelular — multinuclear.

In acord cu aceste principii, sistemul celor cinci regnuri elaborat de Whittaker are următoarea structură:

I. Regnul *Monera* include organisme unicelulare de tip procariot, corespunzînd bacteriilor, organisme cu existență unicelular-solitară sau unicelular-colonială, cu excepția actinomicetelor care au organizare de tip micelial. Modul de nutriție este predominant absorbtiv, iar metabolismul de tip foto- sau chimiosintetic. Reproducerea se face prin diviziune

asexuată, mai rar prin înmugurire. Rar, prezintă fenomene de protosexualitate. Imobile sau mobile (prin flageli simpli, de tip special, sau prin alunecare-tîrîre).

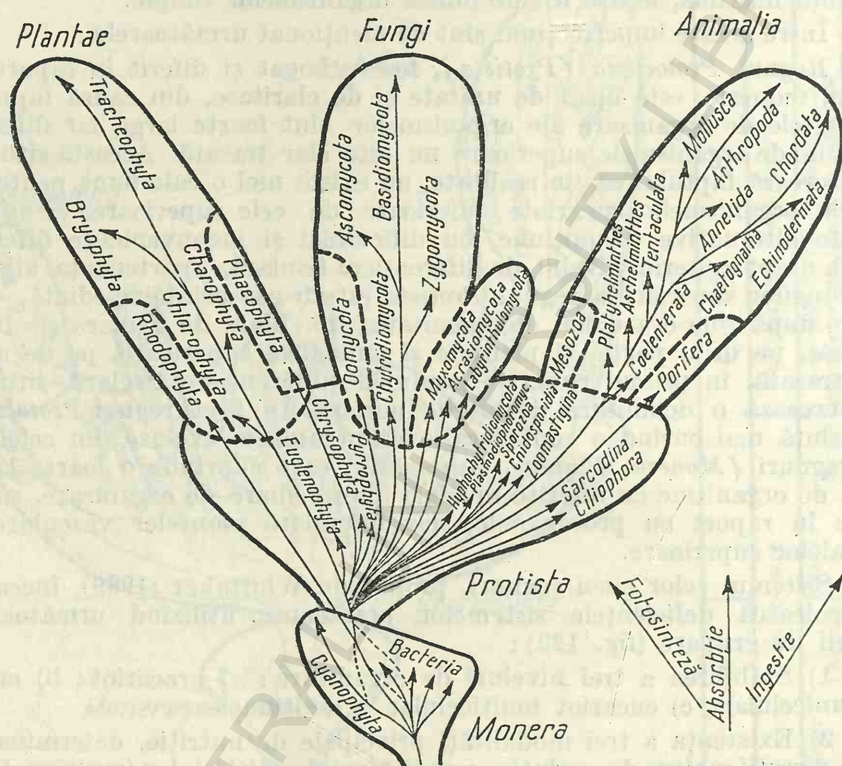


Fig. 122. — Sistemul lui Whittaker de clasificare în cinci regnuri, bazat pe trei nivele de organizare — procariot (regnul *Monera)*, eucariot unicelular (regnul *Protista)* şi eucariot multicelular şi multinucleat.

II. Regnul *Protista* include organisme primar unicelulare sau unicelular-coloniale de tip eucariot. În unele cazuri sînt prezente stadii de viaţă cu structură simplă sau multinucleară. Modul de nutriţie este diferit de la un grup la altul (absorbţie, ingestie, fotosinteză sau combinaţii ale acestor tipuri). Reproducerea este, de asemenea, de tip diferit, incluzînd diviziunea asexuată (la nivel haploid) şi procese sexuale adevărate, cu cariogamie şi meioză. Sînt imobile sau mobile prin flagel de tip superior sau prin alte mijloace.

III. Regnul *Plantae* include organisme multicelulare cu celule eucariote, care au perete celular celulozic, frecvente vacuole în citoplasmă şi pigmenţi fotosintetici în plastide. Modul principal de nutriţie este cel fotosintetic; unele linii au devenit absorbtive. Esenţial imobile, trăiesc ancorate pe un substrat. Prezintă diferenţiere structurală care duce la apariţia unor organe de fotosinteză, ancorare şi sprijin (suport), iar la

formele superioare la formarea unor ţesuturi specializate fotosintetice, vasculare şi de acoperire. Reproducerea este în primul rînd sexuată, cu cicluri de generaţii alternative, haploide şi diploide, primele fiind progresiv reduse spre membrii superiori ai regnului.

IV. Regnul *Fungi*. Exceptînd subregnul *Gymnomycota*, include organisme multinucleare, cu nuclei de tip eucariot, dispersaţi într-un sinciţiu micelial, acoperit de un perete celular, adesea septat, caracterizate prin lipsa plastidelor şi a pigmenţilor fotosintetici. Nutriţia este de tip absorbtiv. Diferenţierea somatică este absentă sau limitată ; în schimb, diferenţierea ţesutului reproductiv şi complicarea ciclului de viaţă sînt foarte marcate la formele superioare. În primul rînd imobile (dar cu flux citoplasmatic în miceliu), trăiesc inclavate în mediu sau în sursa de hrană. Prezintă cicluri reproductive tipice, incluzînd procese sexuale şi asexuale. Micelii, cel mai des haploide la formele inferioare şi dicariotice la multe forme superioare.

V. Regnul *Animalia* include organisme multicelulare de tip eucariot, fără perete celular, fără plastide şi fără pigmenţi fotosintetizanţi. Nutriţia este în primul rînd de tip ingestiv, cu digestie într-o cavitate internă ; unele forme sînt absorbtive ; la unele grupuri lipseşte cavitatea digestivă internă. La formele superioare nivelul de organizare şi de diferenţiere tisulară depăşeşte de departe celelalte regnuri, ducînd la apariţia a diferite sisteme senzoriale neuromotorii. Motilitatea organismelor sau a părţilor lor (la formele sesile) se bazează pe existenţa unor fibrile contractile. Reproducerea predominant sexuată ; stadiile haploide, diferite de cele ale gameţilor, aproape lipsesc la organismele situate deasupra filumurilor inferioare.

Sistemul lui Whittaker, deşi foarte recent creat, este agreat de un mare număr de specialişti, care consideră că el prezintă cel mai bine relaţiile dintre organisme, atît în ceea ce priveşte nivelurile de organizare ale lumii vii, cît şi modul de nutriţie care afectează tipul de organizare. El are avantaje evidente în sensul unei mai pregnante coerenţe a regnurilor, ca unităţi de clasificare decurgînd din precizarea mai netă a caracterelor lor definitorii, dar şi o serie de limitări care sînt evidenţiate chiar de Whittaker, dar care nu sînt legate de lumea bacteriilor.

Anatomia bacteriilor

(Pl. 40–89)

Morfologie

Forma bacteriilor este controlată genetic. Deşi variază destul de mult, în funcţie de condiţiile de mediu, polimorfismul acestor microorganisme este relativ limitat şi caracterizat, de cele mai multe ori, prin predominanţa formei tipice pentru specia dată.

Deoarece forma bacteriilor este greu de apreciat direct în mediile naturale, cunoştinţele de morfologie bacteriană se referă, de obicei, la celulele cultivate, în condiţii artificiale de laborator, în care caz forma celulei poate fi influenţată de vîrsta culturii, de compoziţia mediului, de temperatură etc. Datorită acestui fapt, forma bacteriilor — care reprezintă un criteriu taxonomic important — se apreciază în mod convenţional pe celule provenite din culturi tinere, în faza de creştere activă, pe medii de cultură corespunzătoare şi în condiţii optime de temperatură, tensiunea O_2, pH etc. În culturi vechi, în care cele mai multe bacterii sînt pe cale să degenereze sau să moară, apar celule cu forme aberante (cu aspecte de Y, ramificate, filamentoase etc.), care se observă şi în cazul cultivării în condiţii improprii de mediu (temperatură nepotrivită, concentraţii mari de săruri anorganice, doze subletale de substanţe antibacteriene) ; acestea rezultă din interferenţa unor acţiuni nocive cu procesul de diviziune normală sau din alterarea mecanismelor de permeabilitate selectivă, urmată de imbibiţia cu apă şi autoliza structurilor celulare prin acţiunea enzimelor proprii.

După forma celulei, bacteriile pot fi grupate în cinci mari categorii : 1) *sferice*; 2) *cilindrice*; 3) *spiralate sau elicoidale*; 4) *filamentoase*; 5) *pătrate*.

La cele mai multe specii, celulele-fiice se separă şi rămîn independente datorită agitării mecanice, curenţilor de convecţie din mediu, mişcării browniene, forţelor rezultate din presiunea de turgor a celulelor care cresc, şi, mai ales, activităţii flagelilor, în cazul bacteriilor mobile. La alte specii însă, aparţinînd în special grupului bacteriilor sferice şi uneori al celor cilindrice, celulele-fiice nu se despart la sfîrşitul diviziunii, ci formează grupări caracteristice cu mare valoare taxonomică. De menţionat însă, că rareori toate celulele speciei sînt grupate tipic. Caracteristic este modul de grupare predominant.

Modul de grupare a celulelor după diviziune este în funcţie de raportul geometric dintre diferitele planuri succesive de diviziune şi de tendinţa celulelor-fiice de a rămîne unite. În unele cazuri, gruparea nu reprezintă un caracter morfologic propriu, ci este consecinţa stadiului de creştere sau a condiţiilor de cultură. Spre exemplu, *Corynebacterium diphteriae* are tendinţa să se grupeze în palisadă, iar *Mycobacterium tuberculosis* în grupuri de trei bacili, care dau impresia de structură ramificată. Aceste moduri de grupare reprezintă însă excepţii de la regulă, deoarece cea mai mare parte dintre bacteriile respective apar izolate unele de altele.

1) **Bacteriile sferice** (cocii) au formă sferică, ovoidală, elipsoidală, reniformă, uneori neregulată sau parţial poliedrică, diametrele celulei fiind aproximativ egale. Deoarece această formă este adesea modificată de diferiţi factori de mediu este discutabil dacă în stare vie celula este realmente sferică.

În funcţie de poziţia celulelor-fiice după diviziune, cocii prezintă următoarele şase subtipuri morfologice : a) *cocul simplu* sau izolat, la care celulele rezultate din diviziune rămîn independente; b) *diplococul*, la care diviziunea se face după planuri succesive paralele, celulele rezultate rămînînd grupate cîte două *(Streptococcus pneumoniae)*; c) *streptococul* la care diviziunea se face, de asemenea, după planuri succesive paralele, dar celulele rezultate formează lanţuri de lungimi variabile, ca un şirag de mărgele *(Streptococcus pyogenes)*; d) *tetracocul* sau *tetrada*, la care planurile succesive de diviziune sînt perpendiculare unele faţă de altele, iar celulele rezultate sînt dispuse în grămezi de patru elemente *(Micrococcus tetragenes)*; e) *sarcina*, la care planurile de diviziune sînt orientate în trei direcţii diferite, perpendiculare unul pe altul (al doilea pe primul, şi al treilea pe primele două), de unde rezultă o grupare în cuburi sau pachete *(Sarcina flava, S. aurantiaca)*; f) *stafilococul*, la care planurile succesive de diviziune sînt dispuse în cîteva direcţii, iar organismele rezultate se aranjează în grupări neregulate în formă de ciorchine *(Staphylococcus aureus)*.

Lampropedia are forma unor celule rotunde sau aproape cubice, grupate în şiruri regulate, formînd „tablete" rectangulare de 16, 32 sau 64 de celule agregate, datorită unei matrice extracelulare (fig. 123). Celulele care formează „tablete", avînd în interior incluziuni refringente strălucitoare, sînt acoperite de un înveliş structurat complex, distinct de peretele celular, care nu înconjură celulele individuale, ci numai ansamblul grupării lor. Izolată din rumen, ape mîloase, stagnante, *Lampropedia* formează pelicule pe suprafaţa mediilor lichide.

2) **Bacteriile cilindrice** cunoscute mai ales sub denumirea comună de bacili, au formă de bastonaşe. Raportul dintre cele două axe variază mult, unele bacterii putînd lua un aspect filamentos, iar altele o formă aproape sferic-ovalară *(cocobacili)*; acestea din urmă sînt uneori greu de diferenţiat de coci, dar în culturile pure există totdeauna cîteva celule, suficient de lungi, pentru a indica natura lor cilindrică.

Bacilii sînt drepţi sau uşor încurbaţi la mijloc sau la una din extremităţi, cu capetele tăiate drept ca la *Bacillus anthracis* sau rotunjite ca

la majoritatea celorlalţi. Marginile laterale ale celulei sînt de obicei paralele, dar pot fi şi apropiate la extremităţi, în formă de suveică *(Fusiformis fusiformis)*, sau îndepărtate şi rotunjite la una sau la ambele extremităţi, în formă de măciucă sau de pişcot *(Corynebacterium)*.

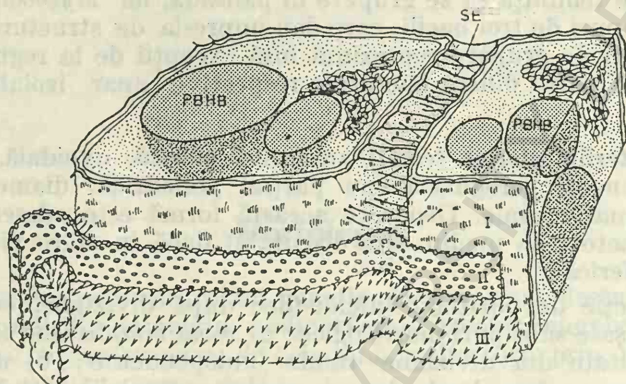


Fig. 123. — Model de structură a două celule adiacente de *Lampropedia hyalina*, evidenţiind prezenţa a trei straturi distincte ale peretelui celular (I — III), complexitatea şi modul în care stratul extern (S.E.) leagă celulele învecinate. PBHB — incluziuni de poli-β-hidroxibutirat (după Pangborn şi Starr, 1966).

Bacilii pot fi grupaţi cîte doi *(diplobacili)*, în lanţuri cu lungimi variabile *(streptobacili)* sau în palisadă (ca scîndurile unui gard), în care caz celulele rămîn apropiate şi paralele în sensul axului lor lung, aşezarea lor rezultînd dintr-o mişcare de basculare a celulei-fiice, avînd ca punct de sprijin peretele transvers recent separat). Unele bacterii *(Agrobacterium stellulatum, Ag. radiobacter, Phyllobacterium stappi)* formează grupuri caracteristice în formă de rozetă sau de stea.

În ceea ce priveşte cauzele grupării bacteriilor după diviziune există cîteva ipoteze:

a) Diviziunea se realizează prin intermediul unui sept transversal care creşte centripet de pe suprafaţa internă a peretelui celular. La bacteriile care se separă după diviziune ar exista un mecanism de scindare a septului în două foiţe, în timp ce la altele acesta ar rămîne nedivizat, realizînd unirea celulelor în grămezi sau lanţuri.

b) În unele cazuri, septul transversal s-ar forma incomplet, astfel încît celulele rezultate din diviziune ar rămîne legate printr-o şuviţă de citoplasmă, care ar face între cele două celule o punte de legătură echivalentă *plasmodesmei*, pusă în evidenţă între celulele multor ţesuturi vegetale şi animale.

c) După Prévot, la unele specii de bacterii sferice gruparea s-ar datora unei substanţe vîscoase, gomoase, sintetizată de celula bacteriană şi depusă pericelular — fie difuz pe toată suprafaţa celulei, fie localizat în anumite regiuni — determinînd diferite tipuri de polarizare a celulelor: *radiară simplă* (diplococ), *diametrală simplă* (streptococ), *biradiară* (tetracoc), *bidiametrală* (sarcina) şi *circumferenţială* (stafilococ).

d) În alte cazuri, gruparea după diviziune depinde de existenţa unor „teci" comune, de prezenţa unor substanţe gomoase sau de continuarea intercelulară a peretelui celular *(Streptococcus faecalis)*. Bacteriile din genul *Sarcina* formează pachete de 8 pînă la cîteva sute de celule datorită existenţei unui strat gros de 150—200 nm, format în totalitate sau în mare parte dintr-un material similar celulozei prezent pe suprafaţa externă a peretelui celular.

3) **Bacteriile spiralate sau elicoidale** cuprind trei subtipuri morfologice: a) vibrionul, în formă de virgulă *(Vibrio cholerae)*; b) spirilul, în formă de spirală cu mai multe ture de spirală rigide *(Spirillum volutans)*; c) spirocheta, în formă de spirală cu mai multe ture flexibile, care se pot strînge sau relaxa *(Borrelia, Treponema* şi *Leptospira)*.

4) **Bacteriile filamentoase** au ca prototip actinomicetele, microorganisme cu asemănări morfologice izbitoare cu fungii, avînd particularitatea de a forma hife cu o tendinţă marcată de ramificare, de unde aspectul lor de miceliu. În unele cazuri *(Sphaerotilus natans)*, aspectul filamentos este determinat de aşezarea celulelor individuale în lanţuri de celule reunite printr-o teacă delicată cu perete neted, care în condiţii favorabile poate acumula hidroxid de fier sau de mangan.

5) **Bacteriile pătrate**, evidenţiate în apa hipersalină din unele bălţi din Peninsula Sinai (Walsby, 1980), au forma unor pătrate cu latura de 1,5 — 11 μm şi o grosime inegală (0,1 μm sau chiar mai mică în regiunea centrală şi 0,2—0,5 μm la periferie, Parkes, 1981). Unele celule au o teacă de înveliş, variabilă ca prezenţă şi mărime, de la aspectul de halou fin pînă la acela de bandă lată de 0,1 μm. Uneori formează placarde de 8—16 pătrate la care se văd net planurile de diviziune. Celulele conţin vacuole cu gaze, care dispar la presiune, situate frecvent de-a lungul marginilor pătratelor şi al liniilor de diviziune. În unele cazuri sînt dispersate la întîmplare în celulă sau chiar o umplu, dînd impresia unui sac turtit, foarte plastic, destins în anumite regiuni de un conţinut globular care îi dă aspectul unei pungi de polietilenă, cu boabe de mazăre, din care cea mai mare parte din conţinut a fost golită (Parkes, 1981). Datorită indicelui de refracţie scăzut al conţinutului lor şi dimensiunilor mici, examinate în contrast de fază, vacuolele disperseazā intens lumina şi au aspectul unor puncte luminoase strălucitoare pe cîmpul întunecat al citoplasmei. Suprafaţa peretelui celular este acoperită de şiruri regulate de subunităţi, aranjate cu o periodicitate de 20 nm şi cu aspectul unei reţele hexagonale, similară celei descrise la *Halobacterium*, cu care sînt foarte înrudite.

Multiplicarea se realizează prin diviziune. În unele cazuri, fiecare bacterie pătrată creşte pînă ia forma unui dreptunghi, care se divide în două pătrate egale. Alteori, diviziunea se face în două planuri ce alternează în unghi drept şi, ca urmare, celulele rezultate din mai multe diviziuni formează placarde divizate ca mărcile poştale într-o coală. Datorită aspectului lor membranos au fost considerate iniţial ca resturi de pereţi celulari ai unor bacterii dezintegrate, pe suprafaţa cărora au rămas ataşate vacuole cu gaze (Pl. 40).

În mod normal, majoritatea bacteriilor au forme mai mult sau mai puţin rotunjite, datorită presiunii de turgor, realizată de apa intrată în celulă din mediul extern diluat. În bălţile foarte sărate, hipertonice, presiunea internă a celulelor este practic nulă şi nu exercită nici o constrîngere asupra pereţilor celulari, în aşa fel încît, teoretic, bacteriile pot lua orice formă. În cazul bacteriilor pătrate, arhitectura învelişului celular, respectiv aşezarea regulată a particulelor care îl compun, reprezintă factorul determinant al acestei forme neobişnuite.

Bacteriile pătrate au fost încadrate în genul *Quadra* aparţinînd probabil grupului *Archaebacteria* (Parkes şi Walsby, 1981).

∸

În afara acestor cinci tipuri morfologice de bază există bacterii cu forme particulare, rezultînd din gruparea lor într-un trichom, prezenţa unor prelungiri celulare (prosteca), a unor apendice acelulare etc.

Bacteriile care formează trihoame

(Pl. 42, 43)

Trihomul este o grupare de celule sub forma unui filament multicelular, uniseriat, rezultat din diviziune, în care celulele adiacente au o suprafaţă relativ mare de contact strîns şi sînt menţinute într-un înveliş parietal comun (Starr, 1973).

Leucothrix este o bacterie filamentoasă, formată în realitate dintr-un trihom multicelular, cu pereţi transversali bine vizibili, cu dimensiuni de 2—5 μm × 0,1 — 0,5 mm. Prezent în mediul marin, creşte ca epifit datorită capacităţii de a forma un „crampon" la baza filamentului, cu care se leagă de diferite substraturi.

În condiţii nefavorabile pentru creşterea rapidă, celulele devin ovoide, transformîndu-se în *gonidii* sau *hormogonii* care ies la extremitatea liberă a filamentului, reprezentînd probabil o formă de răspîndire în natură. Dacă vin în contact cu o suprafaţă solidă, gonidiile sintetizează un nou crampon şi prin creştere şi diviziuni succesive formează un filament. Cînd sînt numeroase, gonidiile au tendinţa de agregare, probabil datorită unei atracţii mutuale, grupîndu-se în formă de rozetă. În acest caz, dau naştere prin creştere unor filamente cu aranjare radială.

Beggiatoa se prezintă sub forma unor trihoame lungi pînă la 15 μm, alcătuite din numeroase celule discoidale, avînd tendinţa de dezintegrare rapidă, dacă sînt tratate mai brutal. În mediile bogate în H_2S (izvoare sulfuroase, nămol, ape poluate orăşeneşti) depun granule de sulf sub formă de picături refringente. *Beggiatoa* se deplasează prin alunecare, dar în acelaşi timp poate suferi mişcări de flexiune şi răsucire, în urma cărora mai multe filamente se pot împleti formînd un smoc complex.

Caryophanon latum se prezintă ca un filament multicelular alcătuit din 10—30 de celule discoidale plate, mai mult late decît lungi, terminat la extremităţi cu celule emisferice. Are dimensiuni de 4 × 40 μm şi este foarte mobil datorită unor flageli peritrihi. Apare la microscop sub formă de discuri alternante luminoase, strălucitoare (corespunzînd structurilor

citoplasmatice și nucleare) și linii întunecate transversale reprezentînd pereții transversali complet sau incomplet dezvoltați.

Sphaerotilus natans formează trihoame lungi de cîțiva mm, prin așezarea în lanțuri a numeroase celule individuale (dimensiune 1—2 μm × × 3 — 10 μm), înconjurate de un manșon fin, cu peretele neted. În cazul în care mediul în care trăiește este bogat în săruri de Fe sau de Mn, hidroxizii acestor metale se acumulează în manșon și îl colorează în galben sau brun. Una dintre extremitățile trihomului servește pentru fixarea pe diferite suprafețe solide în apele curgătoare cu debit mare, facilitînd obținerea hranei chiar cînd volumul de apă este mare și concentrația substanțelor nutritive foarte mică. Reproducerea se realizează prin eliberarea unor celule individuale cu un flagel unic la extremitatea liberă a manșonului, urmată de reconstituirea unor trihoame noi. *Sphaerotilus* are o semnificație ecologică deosebită, deoarece infectează masiv apele din industria hîrtiei, berei, zahărului, ca și pe cele reziduale poluate, afectînd echilibrul lor biologic. Împiedică funcționarea eficientă a instalațiilor de epurare, producînd „umflarea" nămolului activat.

Bacteriile prostecate

(Pl. 44, 45)

Unele bacterii prezintă o complicație morfologică — prosteca (gr. = adaos, apendice, „coadă") sub forma unui apendice semirigid, situat în continuarea unei celule procariote și avînd totdeauna un diametru mai mic decît cel al celulei mature. Este acoperită de o extindere a peretelui celular, care conține citoplasmă lipsită de ribosomi și material nuclear, delimitată de membrana plasmatică.

Există două tipuri de bacterii prostecate:

A. **Bacteriile pedunculate** prezintă un dimorfism caracteristic, populațiile în curs de multiplicare fiind alcătuite din: 1) celule imobile cu aspect de bacil sau vibrion, prevăzute cu o prosteca foarte fină filiformă (cu lungime de peste 20 μm și Ø 0,2 μm) și 2) celule mobile, neprostecate cu un flagel polar *(Caulobacter)* sau subpolar *(Asticcacaulis)*. Celulele cu prosteca se fixează pe diferite substraturi vii sau neanimate cu ajutorul unei structuri extracelulare neregulate, adezive, fizic distinctă de peduncul, localizată la extremitatea acestuia și numită „crampon". Din loc în loc, pedunculul este traversat la intervale neregulate de una sau mai multe benzi transversale colorate întunecat, legate de stratul extern al peretelui celular. Aceste benzi, a căror semnificație nu a putut fi precizată, nu întrerup continuitatea pedunculului și au probabil o structură inelară (Poindexter, 1964).

Bacteriile pedunculate se înmulțesc prin diviziunea binară transversală a celulei, cu formarea unei celule bazale imobile, legată de pedunculul parental și cu eliberarea celulei apicale, foarte mobilă (capabilă de „roire") datorită unui flagel polar sau subpolar. Curînd, după eliberare „roitorul" pierde flagelul și formează în locul lui prosteca cu care se fixează de diferite substraturi.

B. Bacteriile care înmuguresc sînt reprezentate de specii care în urma diviziunii produc două celule asimetrice în sensul unei inegalităţi dimensionale evidente.

Hyphomicrobium vulgare, prezent în ape, sol şi nămol activat, are celule rotunde sau ovale (0,5 × 1,2µm), care formează o prelungire variabilă ca lungime, uneori ramificată, cu Ø 0,2 — 0,3 µm, în continuarea celulei propriu-zise. La un moment dat, o celulă, numită obişnuit celula-mamă, dezvoltă una sau mai multe hife subţiri, scurte sau lungi de cîţiva µm, pentru ca ulterior capătul distal al hifei să se umfle, formînd un corp ovalar, sau mugure, care creşte pînă ajunge la dimensiunile celulei-mamă. Această nouă celulă (fiică), avînd un singur flagel polar sau lateral, rămîne legată de celula-mamă şi înmugureşte progresiv sau se separă şi înoată, purtînd un mic rest de hifă. Ulterior, celula-fiică pierde flagelul, se rotunjeşte şi reia ciclul.

În afară de acest ciclu (,,ciclu celulei-fiică''), după Leifson (1964), celula-mamă continuă să dezvolte porţiunea de hifă rămasă, la extremitatea căreia se va forma o nouă celulă-fiică ş.a.m.d. (,,ciclul celulei-mamă'').

Rhodomicrobium vannielii, bacterie heterotrofă fotosintetizantă, creşte sub formă de colonii ramificate în care mai multe celule piriforme (1,2 µm × 2,8 µm) sînt conectate de hife fine cu Ø uniform de 0,3 µm, dar cu lungime variabilă, separate uneori de un sept transversal. Ramificarea hifei se face de regulă prin dezvoltarea laterală a hifelor intercelulare (fig. 124).

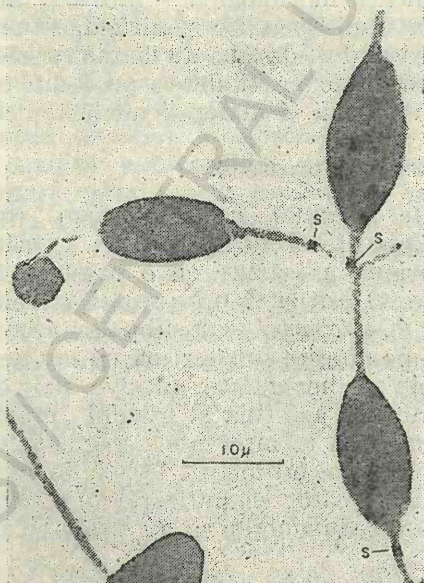


Fig. 124. — *Rhodomicrobium vannielii* — microelectronografie : celule mature reunite prin filamente. Se observă o celulă mică pe cale de formare din filamentul celulei-mamă şi septurile transversale dense (S) în unele filamente (după Poindexter, 1964).

Funcţiile prostecii sînt necunoscute încă. În cazul bacteriilor care înmuguresc este cert că prosteca este implicată în reproducere. În plus, ea ar mări suprafaţa celulei şi implicit a membranei plasmatice, permiţînd sporirea activităţilor asociate (respiraţia şi absorbţia de substanţe nutri-

tive). În cazul celulelor cu „crampon" *(Caulobacter)*, prosteca ar avea rol de fixare, deși frecvent a fost găsită și la bacterii liber plutitoare. Datorită faptului că prezența prostecii scade rata de sedimentare, funcția sa primordială ar fi de a menține celulele aproape de interfața aer—apă, încetinind sedimentarea lor. La bacteriile care se grupează în rozetă, prosteca a fost asociată cu procesul de conjugare, deși nu există probe categorice în acest sens.

Bacteriile cu apendice acelulare

(Pl. 45)

Spre deosebire de bacteriile prostecate, unele bacterii prezintă un aspect filamentos datorită unor apendice acelulare, formate din substanțe secretate sau excretate de ele, nedelimitate de perete celular.

Datorită acestei structuri, *Gallionella ferruginea*, prezentă în mări și apele feruginoase și care apare sub forma unei panglici turtite și răsucite, ar putea fi considerată greșit ca un organism filamentos. În realitate, celula bacteriană are forma unui bob de fasole (0,5 × 1,2 μm) și este situată la extremitatea unui apendice filamentos acelular, format dintr-un produs secretat de ea însăși prin porii situați pe partea sa concavă. Pe măsură ce apendicele acelular crește, celula se răsucește, răsucind în același timp și filamentul. Cînd celula se divide, odată cu separarea celulelor-fiice se separă și filamentele care le leagă, dînd aspecte tipice de bifurcație, după care cele două panglici „gemene" se răsucesc una față de cealaltă. Prin acest mecanism repetat, *Gallionella* poate forma adevărate microcolonii, cu numeroase filamente lungi ramificate dihotomic.

După unii autori, componentul major al apendicelui acelular este hidroxidul feric. El reprezintă produsul final rezultat din oxidarea fierului feros din mediu de către bacterii (autotrofe obligate), iar după alții, bacteriile ar secreta doar o matrice organică, în care hidroxidul feric ar fi depozitat pasiv din Fe^{2+} prezent în mediu (Starr, 1977).

Celulele bacteriene miniaturale (minicelulele)

(Pl. 46)

Minicelulele sînt corpusculi mici, aproximativ sferici, care nu cresc și care sînt formați printr-o septare neobișnuită, în apropierea uneia dintre extremitățile unei bacterii cilindrice. Au, cel mai adesea, un diametru mai mic decît cel al celulei bacilare parentale. Sînt lipsite de material nuclear sau deficiente în ADN. De aceea sînt incapabile de creștere și diviziune.

Au fost descrise inițial de Gardner (1930), ca un proces de diviziune inegală (asimetrică) la *Vibrio cholerae*, observate ulterior și la *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Erwinia amylovora* ș.a.

Denumirea de *minicelule* („minicell'') a fost dată de Adler (1967) care a studiat formarea lor la o tulpină mutantă de *E. coli*. Tulpinile producătoare de minicelule prezintă o rezistenţă crescută la radiaţii ionizante (X şi γ), fapt care permite selecţia lor dintr-o populaţie bacteriană mixtă.

Minicelulele reprezintă un sistem unic, prin definiţie, incapabil de creştere şi diviziune, dar care posedă perete celular, membrană plasmatică, ribosomi şi un sistem generator de energie similare celor ale celulelor normale din care provin, precum şi capacitatea de a-şi menţine integritatea o perioadă îndelungată de timp. Peretele celular are rolul de a le proteja de liză. Transportul activ, utilizarea O_2 şi producerea de ATP se realizează după mecanisme caracteristice celulelor normale, ceea ce demonstrează caracterul funcţional normal al membranei plasmatice. ADN cromosomal este absent sau prezent în cantităţi foarte reduse, sub nivelul de detecţie cu mijloacele actuale.

În cazurile în care celulele parentale conţin plasmide, minicelulele poartă la rîndul lor astfel de unităţi genetice extracromosomale, care segregă independent de ADN cromosomal (Inselburg, 1970). Dacă plasmidele au caracter de conjugon, minicelulele se comportă ca donatori competenţi (F^+) de material genetic în procese de conjugare cu celule F^-, cărora le transmit o copie a plasmidei de sex (Kass şi Yarmolinsky, 1970). De asemenea, minicelulele se pot comporta ca receptoare de material genetic, avînd capacitatea de a forma cupluri de conjugare fertile cu celule de *E. coli* donatoare (F^+, Hfr, F'), prin intermediul pililor de sex (Cohen, 1967). În ambele cazuri, transferul de material genetic are toate particularităţile sistemelor de conjugare bacteriene tipice.

Minicelulele de *E. coli* pot fi infectate productiv cu fagii *E. coli* T4 şi P1, dar numărul de fagi progeni este mai mic decît în cazul celulelor normale.

Mod de formare. Minicelulele apar foarte rar la tulpinile de tip sălbatic sau continuu în cursul creşterii tulpinilor mutante producătoare de celule miniaturale. La cele mai multe specii ele apar de-a lungul întregului ciclu de creştere, la toate temperaturile şi pe toate mediile de cultură, care fac posibilă dezvoltarea celulelor normale, deoarece formarea lor are loc numai în condiţii care permit diviziunea celulei normale şi replicarea cromosomului. Producerea lor poate fi influenţată de faza de creştere a culturii, ca şi de mediul de creştere. Minicelulele pot apărea la fiecare pol al celulei. În unele cazuri, celulele se pot divide de mai multe ori fără a forma minicelule sau, din contră, pot forma secvenţial mai multe celule la un pol, fără să se dividă normal (prin formarea unui sept central în celula pe cale de diviziune).

Mecanismul de formare a minicelulelor este necunoscut. După *modelul Adler şi Hardigree (1972)*, celulele bacteriene ar avea trei situsuri potenţiale de diviziune: unul situat în regiunea centrală a celulei şi cîte unul în fiecare regiune polară a celulei. Situsurile din regiunile polare ale celulei parentale sînt destinate să devină situsuri localizate în regiunea centrală a celulelor progene (din generaţia următoare). Formarea minicelulelor s-ar produce în acord cu acest model prin activarea prematură, la întîmplare, a situsurilor de diviziune localizate în regiunea polară.

Modelul Donachie (1973) și Teather (1974) sugerează un mecanism diferit: situsurile de diviziune care asigură localizarea centrală a septului sînt în mod obișnuit blocate după diviziune. Dacă ele rămîn, printr-un mecanism încă necunoscut, active, în generaţia următoare vor fi localizate în regiunea polară și vor putea da naștere unui sept, care duce la apariţia unei minicelule.

Importanţa descoperirii minicelulelor. Descoperirea minicelulelor a permis aprofundarea unor cunoştinţe referitoare la biologia moleculară a plasmidelor şi a conjugării bacteriene, a diviziunii celulare (corelată cu replicarea şi segregarea informaţiei genetice), a sintezei peretelui celular şi a membranelor şi la repartizarea enzimelor şi a altor constituenţi celulari (Frazer şi Curtiss III, 1975; Helmstetter şi colab., 1979).

Se apreciază că din cauza lipsei ADN şi a capacităţii de a efectua sinteza de constituenţi macromoleculari, protoplaştii minicelulelor ar putea furniza un model experimental pentru studiul proceselor de transport în sistemele microbiene, la fel de util ca hematiile pentru sistemele eucariote.

Minicelulele bacteriilor patogene ar putea fi utilizate pentru producerea unui vaccin viu, capabil să confere o imunitate protectoare îndelungată (Tankersley, 1973).

Proprietăţi fizice

Dimensiuni. Bacteriile au dimensiuni foarte mici (în medie 0,5—1 µm × 3 — 6 µm). Cele mai mici aparţinînd genului *Mycoplasma* au Ø 125 — 250 nm; cele mai mari pot ajunge 10—20 µm lungime, iar în cazul formelor filamentoase, în mod excepţional, chiar 500 µm *(Saprospira grandis)* (tabelul nr. 14).

Sub raportul dimensiunilor, cele mai mici bacterii se suprapun virusurilor mari *(Poxvirus)*, vizibile la microscopul fotonic, iar cele mai mari depăşesc mărimea celor mai mici protiste eucariote. De aceea, dimensiunile bacteriilor nu pot fi utilizate ca un caracter distinctiv diferenţial absolut între ele şi alte entităţi. Ca regulă generală însă, dimensiunile medii ale bacteriilor sînt cu mult mai mici decît ale celulelor eucariote.

Deoarece celulele diferă mult ca formă, Stanier (1970) recomandă **volumul** ca unică bază satisfăcătoare pentru a aprecia mărimea lor. Volumul celulei bacteriene poate fi apreciat cu ajutorul formulelor de calcul aplicate corpurilor geometrice regulate (în special sfera şi cilindrul) în care se pot încadra cele mai multe bacterii (tabelul nr. 15).

Suprafaţa celulei bacteriene se poate calcula încadrînd bacteriile într-o formă geometrică regulată, pe baza dimensiunilor celulei. Ea variază între $1,104 \times 10^{-9}$ cm² la *Mycoplasma*, $35,340 \times 10^{-9}$ cm² la *E. coli* şi $12\,576 \times 10^{-9}$ cm² la *Saprospira grandis*.

Densitatea sau greutatea specifică a celulei bacteriene vii (în stare umedă) variază între 1,07 şi 1,32. Valoarea acestui indice este în funcţie de proporţia relativă a substanţelor celulare cu densitate diferită de aceea a apei (D = 1)*). Deoarece compoziţia chimică a bacteriilor este

*) Lipidele au densitatea sub 1,0, glucidele 1,4—1,6, proteinele 1,5, acizii nucleici 2,0, sărurile minerale 2,0—2,5.

Tabelul nr. 14

Dimensiunile cîtorva specii de bacterii

Specia	Dimensiuni în μm		Specia	Dimensiuni în μm	
	Lăţime	Lungime		Lăţime	Lungime
Bacillus megaterium	1,2–1,5	2,0–4,0	*Mycoplasma* sp.	Ø 125–250 nanometri	
B. subtilis	0,3–2,2	1,2–7,0	*Saprospira grandis*	0,8–1,0	500
Brucella melitensis	0,5–0,7	0,6–1,5	*Sphaerotilus natans*	0,7–2,4	3,0–10,0
Chlamydia sp.	0,2	1,5–150 (filamente)	*Staphylococcus aureus*	Ø 0,8–1,0	
E. coli	0,5	2,0	*Thiospirillum jenense*	2,5–4,0	100
Francisella tularensis	0,2	0,3–0,7	*Treponema pallidum*	0,25–0,3	6,0–14,0
Mycobacterium tuberculosis	0,3–0,6	0,5–4,0	*Yersinia pestis*	0,5–1,0	1,0–2,0

Tabelul nr. 15

Mărimea comparativă a unor virusuri şi microorganisme exprimată prin volumul lor (modificat, după Stanier, 1970)

Unitatea de structură	Grupul sistematic	Volumul unităţii de structură (μm^3)		
		Limite normale	Limite extreme	Limitele grupului sistematic
Virion	*Poliovirus* *Myxovirus* *Rhabdovirus* *Poxvirus*	0,00001 0,0005 0,0015 0,01	limite fixe pentru fiecare grup	0,00001–0,01
Celula procariotă (bacterie)	*Rickettsia* *Spirochaeta* *Eubacteria* *Myxobacteria* *Cyanobacteria*	0,01–0,03 0, 1–2 1–5 1–5 5–50	0,01–0,03 0,05–1 000 0,10–5 000 0,50–20 0,10–5 000	0,01–5 000
Celula eucariotă	levuri alge unicelulare protozoare	20–50 5 000–15 000 10 000–50 000	20–50 5–100 000 20–150 000 000	5–150 000 000

variabilă chiar la aceeaşi specie, în funcţie de condiţiile de mediu sau de vîrsta celulei, densitatea lor este caracteristică numai în raport cu anumite condiţii de creştere. Astfel, celulele tinere, care sînt turgescente, au o

densitate mai mică decît cele bătrîne, iar la bacteriile cultivate pe medii lichide valoarea ei este mai mică decît la cele cultivate pe medii solidificate. Datorită densităţii lor mici, bacteriile rezistă la sedimentare spontană în medii gazoase şi lichide, din care însă pot fi separate prin centrifugare.

Greutatea unei bacterii vii poate fi calculată împărţind greutatea unei anumite mase de celule la numărul unităţilor componente. Celulele de *E. coli*, care sînt de 500 de ori mai mici decît o celulă vegetală sau animală de dimensiuni medii (Ø 10 μm), au greutatea de 10^{12} dal, respectiv de 6×10^6 dal ori mai mare decît greutatea unei molecule de apă (g.m.= = 18 dal).

Raportul dintre suprafaţa celulei şi greutate are o valoare foarte ridicată la bacterii. În cazul unui coc cu diametrul de 1 μm acest raport este de ~ 55 000, la *E. coli* ~ 81 000, la *Chlamydia* ~ 193 000, iar la *Mycoplasma* ~ 290 000. Acelaşi raport la om $\left(\frac{24\,000\ \text{cm}^2}{70\,000\ \text{g}}\right)$ este de 0,342, respectiv de 84 146 ori mai mic decît la *B. megaterium*, de 239 233 ori mai mic decît la *E. coli* şi de 850 611 ori mai mic decît la *Mycoplasma* (tabelul nr. 16).

Tabelul nr. 16

Valoarea comparativă a raportului suprafaţă/greutate la diferite bacterii faţă de alte celule şi de organismul uman

Organismul sau celula	Suprafaţa (cm²) × 10^{-9}	Volumul (cm³) × 10^{-12}	Greutatea (g) × 10^{-12}	Suprafaţa cm² / greutate	$\frac{S}{G}$ bacterie / $\frac{S}{G}$ om
Mycoplasma sp.	1,104	0,003	0,004	290 909	850 611
Francisella tularensis	2,513	0,009	0,010	242 424	708 842
Pasteurella multocida	7,854	0,036	0,040	197 628	577 859
Chlamydia sp.	10,053	0,047	0,052	193 939	567 073
Brucella sp.	25,447	0,297	0,326	77 922	227 842
Rickettsia sp.	30,630	0,334	0,367	83 422	243 924
Staphylococcus aureus	31,416	0,523	0,576	54 545	159 488
Escherichia coli	35,343	0,393	0,432	81 818	239 233
Salmonella typhi	57,687	0,830	0,912	63 217	184 845
Bacillus megaterium	223,838	7,068	7,775	28 778	84 146
Caryophanum latum	4 559,236	447,130	524,842	8 687	25 400
Gallionella sp.	20 905,571	1 710,597	1 881,657	11 110	32 485
Limfocit	2 010,619	268,083	294,890	6 818	19 886
Macrofag	12 566,370	4 188,80	4 607,670	2 727	7 954

Datorită raportului foarte mare dintre suprafaţă şi volum al bacteriilor, comparativ cu alte organisme, asemănător aceluia al particulelor de substanţe în stare de dispersie coloidală, o cantitate mică de bacterii, de exemplu 1 g de *E. coli*, care conţine $1,8 \times 10^{12}$ celule, însumează o suprafaţă totală de contact cu mediul de circa 56 000 cm²; pentru comparaţie menţionăm că 1 g celule de drojdie conţine $8,3 \times 10^9$ celule, care au o suprafaţă de 9 100 cm².

Mărimea considerabilă a acestei suprafețe reactive de la interfața celulară — mediu este deosebit de importantă, deoarece, practic, toate substanțele care intră și ies din celulă trec prin această zonă (tabelul nr. 16).

Teoretic, pe baza unor considerente de ordin biologic și biochimic, *limita inferioară de mărime* a unei celule bacteriene este determinată de posibilitatea ei de a conține toți constituenții necesari pentru creștere și diviziune, respectiv un număr minim de enzime diferite (probabil cîteva sute), aflate fiecare într-un număr variabil de molecule, acizi nucleici, glucide, lipide etc. Cea mai mică bacterie vizibilă la microscopul fotonic are dimensiuni foarte apropiate de această *limită moleculară* necesară pentru menținerea funcțiilor celulare. Celulele cu dimensiuni mai mici nu ar fi fizic suficient de cuprinzătoare pentru a conține întreg echipamentul enzimatic și moleculele necesare pentru viață.

În cazul microorganismelor eucariote, limita cea mai mică de mărime este determinată de *limitări structurale*: cele mai mici protiste eucariote sînt algele din genul *Micromonas* (*M. pusilla* 1 — 1,5 μm) cu un singur cloroplast și o singură mitocondrie, care alături de nucleu ocupă cea mai mare parte din celulă. Orice reducere de dimensiuni dincolo de această limită nu se poate face decît prin eliminarea unui organit celular, fără de care însă funcțiile metabolice ar înceta de îndată. Ca regulă generală, celulele eucariote sînt însă mai mari decît cele procariote și conțin structuri absente la procariote.

Celulele procariote nu pot depăși anumite limite de mărime și, în general, nu pot ajunge la dimensiunile foarte mari ale celulelor eucariote.

Limita superioară de mărime a unui organism unicelular este posibil corelată cu raportul suprafață/volum, avînd în vedere că toți nutrienții trebuie să pătrundă în celulă, iar produșii de catabolism să fie eliminați. Pe măsură ce dimensiunile unei celule cresc, volumul ei crește mult mai rapid decît suprafața (volumul crește la cub în raport cu raza celulei, în timp ce suprafața crește cu raza la pătrat). Cînd raza celulei crește de trei ori, volumul crește de 27 de ori (3^3), iar suprafața numai de 9 ori (3^2). În prezența acestui dezechilibru, celula nu poate îngloba nutrienți și elimina substanțe reziduale în acord cu necesitățile crescute ale volumului celular mărit (Nester și colab., 1973).

Celulele eucariote mai mari au rezolvat această problemă fie prin modificarea adecvată a formei (aducînd astfel părțile interne ale celulei aproape de suprafață), fie, mai ales, prin prezența curenților citoplasmatici care asigură „circulația" nutrienților și a produșilor de uzură dintr-o zonă în alta.

Ca o regulă generală, valabilă la toate nivelele de complexitate biologică, rata metabolismului este invers proporțională cu mărimea organismului, iar rata de creștere (determinată în special de rata globală a metabolismului) crește pe măsură ce dimensiunile celulare scad în corelație cu raportul suprafață/volum.

Dimensiunile mici ale bacteriilor apar ca o condiție esențială pentru creșterea și multiplicarea lor rapidă, în comparație cu celulele eucariote, ceea ce le conferă un mare avantaj biologic în natură, asigurînd supraviețuirea lor în competiție cu alte organisme. Celulele mari au nevoie de

mult timp pentru ca nutrienţii să pătrundă în celulă şi să fie metabolizaţi pentru a asigura creşterea acesteia.

Un alt factor care pare să determine o limită superioară de mărime a celulelor bacteriene este dificultatea de menţinere a unei reglări satisfăcătoare şi de coordonare a activităţii metabolice într-o celulă mare cu organizare de tip procariot. Unele bacterii foarte mari, *Spirillum volutans*, *Chromatium okenii*, *Thiospirillum jenense* etc., nu pot fi cultivate decît extrem de greu, în contrast cu bacteriile mici din acelaşi grup fiziologic (Stanier, 1970). Explicaţia constă în faptul că la aceste bacterii condiţiile fizicochimice necesare dezvoltării sînt foarte restrînse, iar capacitatea de reglare a funcţiilor metabolice esenţiale pentru a le conferi flexibilitatea adaptativă la modificări minore ale mediului foarte limitată.

Ultrastructura celulei bacteriene

Datorită dimensiunilor mici şi particularităţilor fizico-chimice ale structurilor componente, organizarea internă a bacteriilor a fost mult timp ignorată sau chiar contestată, unii cercetători considerîndu-le pur şi simplu ca un fel de „saci cu enzime”. Descrierea constituenţilor structurali ai celulei bacteriene a fost posibilă datorită perfecţionării tehnicilor de studiu, în special tehnicilor de citochimie şi celor de microscopie electronică. Luînd ca reper peretele celular, constituenţii celulei bacteriene pot fi grupaţi în două mari categorii : *intraparietali*, care formează protoplastul (membrana plasmatică, mezosomii, citoplasma,nucleoidul, ribosomii, sporul, aparatul fotosintetic, incluziunile, vacuolele, rhapidosomii, magnetosomii), şi *extraparietali* (capsula, stratul mucos, glicocalixul, „spinii”, flagelii, fimbriile şi pilii.

Peretele celular

(Pl. 47—49)

Celula bacteriană este delimitată de un perete celular bine definit structural şi cu consistenţă rigidă. Situat în afara membranei citoplasmatice, el este acoperit, la unele specii, de o capsulă sau de un strat mucos pericelular, iar la bacteriile mobile este străbătut de flageli. Existenţa peretelui celular la bacterii a fost bănuită de Conn încă din 1872, pe baza formei relativ constante, a rezistenţei la acţiunea unor factori de mediu şi a posibilităţii de grupare tipică a celulelor.

Datorită indicelui de refracţie mic, peretele celular este invizibil ori foarte greu vizibil (ca de ex., la *Beggiatoa mirabilis)* la celulele vii examinate la microscopul fotonic. Evidenţierea lui este însă posibilă prin colorare selectivă sau prin examinarea la microscopul electronic. La bacteriile tinere, care au citoplasmă abundentă, compactă şi omogenă, peretele celular aderă intim la conţinutul celular subiacent. La celulele bătrîne sau în curs de liză, plasmoliză etc., peretele celular devine evident, fiind depărtat de citoplasmă.

Datorită particularităţilor sale, punerea în evidenţă a peretelui celular se poate face fie prin izolarea lui ca structură intactă completă, fie prin modificarea raporturilor lui spaţiale cu citoplasma. Această

modificare se poate obţine pe calea dezintegrării celulare prin ultrasonare sau agitare cu perle de sticlă, cu ajutorul tehnicii de microdisecţie sau prin provocarea unui şoc osmotic (inducţie de plasmoliză sau plasmoptiză) ori a autolizei celulare. Existenţa şi constituţia chimică a peretelui celular pot fi demonstrate şi indirect, prin degradarea lui pe cale enzimatică sub acţiunea lizozimului, enzimă care atacă mucopolizaharidele.

Examinat la microscopul electronic, peretele celular izolat are aspectul unui sac gol, care conservă forma bacteriei din care provine, şi o constituţie asemănătoare ochiurilor unei plase, cu tramă regulată, care apare ca fiind formată din fascicule de fibre paralele care se încrucişează. Grosimea lui variază între 15 şi 35 nm, excepţional putînd să ajungă la 80 nm, ca la *Lactobacillus acidophilus*. Este în general mai subţire la celulele tinere, care cresc rapid, decît la celulele bătrîne sau la cele la care sinteza proteinelor este inhibată prin lipsa unui aminoacid sau sub acţiunea unui antimetabolit.

În funcţie de prezenţa şi particularităţile de structură ale peretelui celular, Gibbson şi Murray (1978) au propus următoarele 3 diviziuni în cadrul regnului *Procaryotae* :

1) *Firmacutes* (l. *firmus* = tare; *cutis* = piele, înveliş), corespunzînd bacteriilor Gram-pozitive cu perete celular gros, lipsit însă de membrana externă.

2) *Gracilicutes* (l. *gracilis* = subţire), corespunzînd bacteriilor Gram-negative cu peretele celular în mod obişnuit subţire, avînd în structura sa membrană externă.

3) *Mollicutes* (l. *mollis* = moale, delicat), corespunzînd genului *Mycoplasma*, care cuprinde bacterii Gram-negative fără perete celular uniform.

Sînt de remarcat, în plus (Willet, 1977), particularităţile de structură şi de natură chimică ale peretelui celular la bacteriile acidorezistente, la care se găsesc mai multe tipuri de lipide complexe neîntîlnite la alte categorii de bacterii.

În funcţie de structură şi de compoziţia chimică, pereţii celulari ai bacteriilor aparţin la trei categorii, care coincid cu modul de colorare, *Gram-pozitiv*, *Gram-negativ* sau *acidorezistent*. Ele au drept constituent comun *peptidoglicanul*, dar se deosebesc în ceea ce priveşte raportul, prezenţa, natura, cantitatea şi aranjamentul structural al proteinelor, polizaharidelor şi lipidelor (tabelul nr. 17).

Peretele celular al bacteriilor Gram-pozitive apare la microscopul electronic ca un strat unic, relativ omogen, deşi frecvent pot fi deosebite mai multe structuri contigue, foarte rar bine definite. Componentul major este peptidoglicanul (80—90 % din greutatea uscată), care apare foarte net după colorare cu săruri ale metalelor grele şi poate fi degradat după tratare cu lizozim. Sensibilitatea la lizozim este mai mare în faza de creştere logaritmică (stratul peptidoglicanic puţin dezvoltat) decît în cea staţionară în care sinteza de peptidoglican continuă pentru a produce pereţi mai groşi.

În afară de peptidoglican, peretele celular al bacteriilor Gram-pozitive mai conţine proteine şi polizaharide care includ acizii teichoici, teichuronici, neteichoici şi polizaharide neutre.

Tabelul nr. 17

Compoziţia chimică a principalelor tipuri de perete celular la bacterii (după Willet, 1977)

Bacterii Gram-pozitive	Bacterii Gram-negative	Bacterii acidorezistente
Peptidoglican 0,02–0,06 μm (multistrat) Proteine Acizi teichoici Acizi teichuronici Polizaharide	Peptidoglican 0,01 μm (monostrat) Lipoproteine Lipopolizaharide Fosfolipide Polizaharide	Peptidoglican 0,01 μm (monostrat?) Lipoproteine Acid micolic Arabinogalactani Ceara D Factorul Cord Sulfolipide Micozide

P e p t i d o g l i c a n u l (sin. *mureină* prin analogie cu denumirea de proteină de la lat. *murus* = perete), *glicopeptid*, *mucopeptid*, *glucozaminopeptid*, *mucocomplex*, component parietal caracteristic şi comun tuturor bacteriilor, cu excepţia genului *Mycoplasma*, a formelor L şi a bacteriilor halofile extreme, este un heteropolimer compus dintr-o porţiune glican şi o componentă peptidică.

Porţiunea glicanică — foarte uniformă — are structura unor lanţuri lineare formate din resturile alternante a două N-acetilhexozamine diferite (N-acetilglucozamina şi acidul N-acetilmuramic), legate între ele prin legături β-1,4. Grupările carboxil (—COOH) ale resturilor de acid N-acetilmuramic furnizează punctele de legare ale lanţurilor peptidice.

Iniţial s-a considerat că lanţurile de glican sînt foarte lungi şi înconjură complet celula bacteriană. În prezent este demonstrat că atît porţiunea glican, cît şi cea peptidică prezintă numeroase grupări terminale, reflectînd dinamica creşterii bacteriilor şi reprezentînd rezultatul acţiunii autolizinelor în cursul biosintezei peretelui celular.

Componenta peptidică conţine ca unitate de construcţie un tetrapeptid cu structura L-alanil-γ-D-glutamil-L-R_3-D-alanină, în care natura restului L — R_3 variază de la o bacterie la alta. Astfel, L — R_3 poate fi un aminoacid neutru (L-alanina sau L-homoserina), un aminoacid dicarboxilic (acidul L-glutamic) sau un aminoacid diaminat (L-lizina, L-ornitina, L-hidroxilizina, acidul LL-diaminopimelic sau acidul mezodiaminopimelic).

Unităţile tetrapeptidice aparţinînd lanţurilor de glican adiacente sînt, la rîndul lor, legate prin intermediul unor „punţi" specializate, interpeptidice. Legăturile se fac între grupul carboxil al D-alaninei terminale a unui lanţ peptidic şi grupul liber NH_2 al acidului diaminopimelic pe al doilea lanţ.

În raport cu această structură chimică de bază, atît glicanii, cît şi tetrapeptidele pot suferi variaţii de structură, care nu modifică însă semnificativ arhitectura generală a moleculei.

Dintre compuşii citaţi, acidul muramic, D-alanina, acidul D-glutamic şi acidul pimelic sînt întîlniţi în natură numai la bacterii (Ghuysen, 1977). Astfel alcătuit, sacul peptidoglicanic este în esenţă o moleculă unică, gigantă şi rigidă, care formează în jurul protoplastului bacterian o reţea ca o plasă rigidă, cu „ochiuri" mici. La bacteriile Gram-negative sacul mureinic poate fi conceput ca o reţea bidimensională sau chiar ca un monostrat molecular, cu structură relativ constantă (fig. 125). În opoziţie

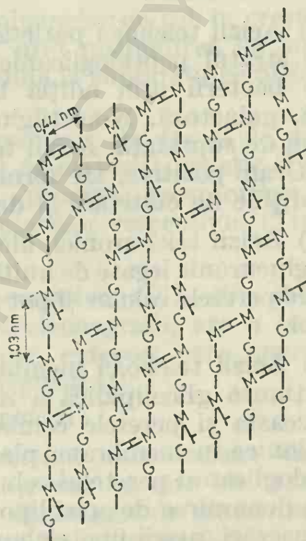


Fig. 125. — Înveliş unimolecular de peptidoglican în peretele celular la *E. coli*. Lanţurile de glican polimerizate de la resturi alternante de N-acetilglucozamină (G) şi acid N-acetilmuramic (M) au o lungime medie de 50 unităţi dizaharidice. Distanţa repetată intracatenară este de 103 nm, iar cea intercatenară de 0,44 nm. De fiecare rest M sînt legate peptide cu secvenţa L-alanil-D-izoglutamil-(L)-mezodiaminopimelil-(L)-D-alanină, peptide monomere, peptide dimere. Aproximativ 2/3 din unităţile peptidice sînt dimere, deci gradul de legare încrucişată este de 33% (după Tipper şi Wright, 1977).

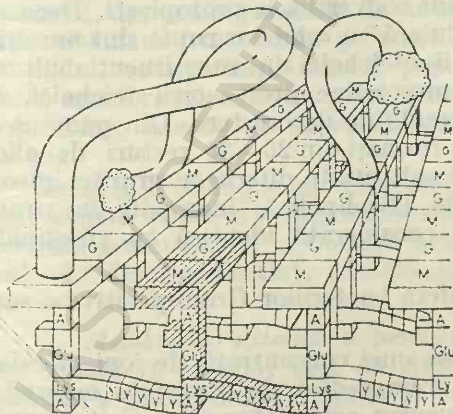


Fig. 126. — Model de structură moleculară a peptidoglicanului la *Staphylococcus aureus*. Glicanul format din dizaharide (G-M) polimerizate este reprezentat sub forma unor benzi rectangulare de care sînt legate din loc în loc molecule de acid teichoic (sub forma unor „tuburi" flexibile). Lanţurile de glican sînt menţinute paralel, formînd un înveliş, prin intermediul peptidelor care formează punţi transversale şi paralele cu învelişul glicanic (după Tipper şi Wright, 1977).

cu aceasta, la bacteriile Gram-pozitive el formează o moleculă gigantă rigidă (g.m. 5×10^9 dal) cu o foarte mare variabilitate de compoziţie chimică, avînd o structură de reţea tridimensională, deoarece legăturile încrucişate („cross-linked") se fac în două planuri ale spaţiului (fig. 126).

Peptidoglicanul poate fi atacat de lizozim şi de penicilină. Lizozimul atacă specific legăturile glicozidice β-1,4 dintre acidul muramic şi resturile glicozaminil, determinînd liza celulelor în repaus, în timp ce penicilina, care inhibă treapta terminală în biosinteza mureinei (formarea punţilor peptidice), lizează numai celulele care cresc rapid.

Acizii teichoici (gr. *teichos* = zid, perete) sînt molecule polimere lungi şi flexibile, formate din 1,5-poli (ribitol-fosfat) şi 1,3-poli (glicerolfosfat) localizate exclusiv în peretele celular, membrana plasmatică şi straturile capsulare ale bacteriilor (Baddiley, 1972; Wicken şi Knox, 1975). Sînt prezenţi numai la bacteriile Gram-pozitive şi aparţin la trei categorii distincte:

1) Acizii teichoici parietali, de la suprafaţa celulei, sînt legaţi covalent de stratul peptidoglicanic al peretelui celular. Ei sînt modificaţi la diferite bacterii prin adiţia la unităţile poliol de D-alanină, D-lizină, glucoză, galactoză, N-acetilglucozamină, care le conferă capacitatea de antigene de suprafaţă. Acizii teichoici parietali nu se găsesc la toate bacteriile Gram-pozitive, iar formarea lor este dependentă în mare măsură de condiţiile de cultivare şi de mediu.

2) Acizii teichuronici, alcătuiţi din molecule de N-acetilglucozamină şi acid glucuronic legate de unităţi dizaharidice repetate, sînt, de asemenea, legaţi de peretele celular şi pot fi găsiţi la aceeaşi bacterie asociaţi cu acizii teichoici.

3) Acizii teichoici membranari sau lipoteichoici sînt legaţi covalent de fracţiunea glicolipidică a membranei plasmatice şi formează o reţea între aceasta şi peretele celular. Sînt menţinuţi prin forţe hidrofobe şi posibil ionice în membrana plasmatică şi prin interacţiuni ionice între ei şi peptidoglicanul peretelui celular. Asocierea lor covalentă cu glicolipidele a dus la denumirea de acizi lipoteichoici (Wicken şi Knox, 1975). Datorită acestei aşezări, acizii lipoteichoici rămîn ancoraţi în membrana protoplastului cînd bacteriile Gram-pozitive sînt convertite la protoplaşti. Deoarece pot fi izolaţi din fracţiunea „intracelulară" a celulelor rupte sînt numiţi şi acizi teichoici „intracelulari". Acizii lipoteichoici sînt constituenţi mult mai caracteristici pentru bacteriile Gram-pozitive decît acizii teichoici, iar sinteza lor nu este dependentă de condiţiile de creştere. Din punctul de vedere al compoziţiei lor chimice sînt formaţi din 25–30 resturi de glicerolfosfat (legături 1 → 3 fosfodiester) substituite diferit cu grupări glicozil şi D-alanil, legate de o componentă glicolipidică, îngropată în stratul extern al membranei plasmatice şi considerată identică cu glicolipidul liber al acestuia.

Acizii teichoici, în general, conferă bacteriilor Gram-pozitive o serie de proprietăţi importante:

— au rol esenţial în menţinerea unei concentraţii de ioni metalici, în particular Mg^{2+}, în micromediul reprezentat de suprafaţa externă a membranei plasmatice, importantă pentru activitatea unor sisteme enzimatice membranare dependente de cationi (Hughes şi colab., 1973). Acizii teichoici din peretele celular leagă ionii (în special Mg^{2+}) din mediu, iar acizii lipoteichoici îi transmit la enzimele biosintetice. Ei funcţionează astfel ca un mecanism molecular de creştere a concentraţiei Mg^{2+} pe supra-

fața celulară. Dovada o constituie faptul că în culturi deficiente în Mg^{2+} cantitatea de acizi teichoici crește;

— deși au rol mic în rigiditatea celulară, acizii teichoici au rol arhitectural, contribuind la modificarea structurii tridimensionale a peptidoglicanului de care sînt legați;

— după cum s-a demonstrat la unele specii (*Streptococcus pyogenes* etc.), acizii teichoici și teichuronici joacă un rol important ca determinanți de patogenitate (inhibă fagocitoza și protejează bacteriile contra efectului bactericid al fagocitozei) (Steinmetz și Balko, 1973) și acționează ca determinanți ai reacțiilor de hipersensibilitate;

— leagă și controlează activitatea autolizinelor cu rol în creșterea și diviziunea peretelui celular, fiind implicați prin răspîndirea lor în toată structura peretelui în localizarea acestor enzime la suprafața celulelor și în modularea activității lor;

— acizii lipoteichoici acționează ca receptori de fag și de colicine. În măsura în care fagii stimulează schimbul de material genetic și recombinări genetice consecutive transducției, prezența receptorilor de fag creează indirect avantaje adaptative bacteriilor respective (Tipper și Wright, 1977).

Peretele celular al bacteriilor Gram-negative (Pl. 49), deși mai subțire, este distinct stratificat pe microelectronografii, are o structură mai complexă, datorită prezenței membranei externe, care apare cu o structură similară membranei plasmatice (triplustrat).

El este alcătuit din următoarele structuri:

1. *Complexul peptidoglican — lipoproteină* este situat în zona mediană a peretelui, are o grosime de 1,5—3,0 nm și este electronodens. Poate fi îndepărtat prin tratare cu lizozim. Este legat de membrana plasmatică prin intermediul unor peptidoglicani în curs de formare și este lipit de ea, din cauza presiunii de turgor a celulei vii, care împinge membrana plasmatică maleabilă pe stratul neelastic peptidoglicanic (Rogers, 1970). În același timp, stratul peptidoglicanic este legat covalent de stratul membranei externe prin intermediul unor molecule globulare de lipoproteine, situate pe suprafața sa externă, care străbat spațiul periplasmic.

Stratul peptidoglicanic reprezintă 2,4— ~ 10 % din greutatea peretelui celular și are o compoziție chimică foarte asemănătoare la toate bacteriile Gram-negative. Conține acid N-acetilmuramic, N-acetilglucozamină, 2,6-diaminopimelat, alanină și glutamat în proporții molare de 1 :1 :1 :2 :1.

2. *Membrana externă a peretelui celular*, numită astfel deoarece este situată la exterior față de stratul peptidoglicanic și de membrana plasmatică („membrana internă"), este o structură foarte caracteristică bacteriilor Gram-negative (fig. 127). Are o grosime de 6—20 nm. Poate fi îndepărtată cu detergenți 2%, fenol 45% sau EDTA 30—60 %.

Membrana externă este alcătuită din fosfolipide (35 %), proteine (15 %) și lipopolizaharide (50 %). Detaliile de structură sînt în general puțin cunoscute, dar numeroase date pledează pentru ipoteza că fosfolipi-

dele ar forma un strat intern continuu, în timp ce lipopolizaharidele ar fi asociate cu stratul extern.

Dintre constituenţii membranei externe cel mai mult studiat, datorită importanţei sale practice (determină activitatea endotoxică şi patogenitatea, unele proprietăţi antigenice şi sensibilitatea la fag), este lipopolizaharidul, constituent termostabil al învelişurilor externe la bacteriile Gram-negative, de la care poate fi izolat şi purificat cu uşurinţă (Lüderitz, 1962; Galanos, 1969), (Pl. 50).

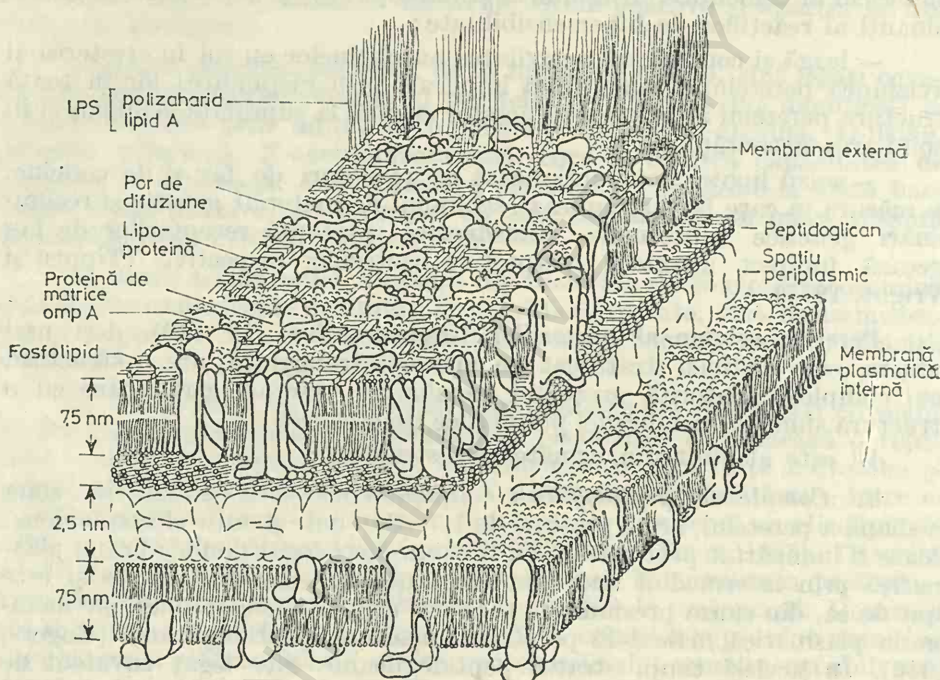
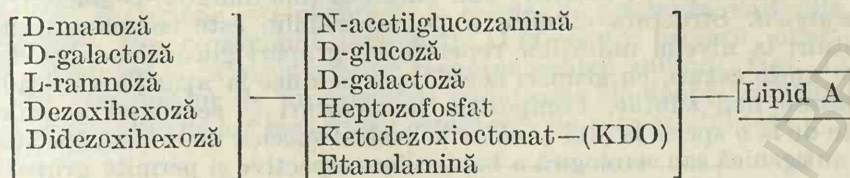


Fig. 127. — Reprezentarea schematică a învelişurilor celulare, evidenţiind structura membranei externe a peretelui celular şi raporturile cu spaţiul periplasmic şi membrana citoplasmatică (după DiRienzo şi Inouye, 1980).

Ca structură generală, lipopolizaharidele sînt alcătuite dintr-o componentă lipidică (lipidul A) legată covalent de un oligozaharid (porţiunea centrală R), care, la rîndul său, este legat de un polizaharid. Structura lipidului A, ca şi aceea a porţiunii R sînt relativ invariabile, deoarece conţin constituenţi relativ similari la diferite specii. În schimb, polizaharidul, care este foarte variabil ca structură şi compoziţie chimică, poartă o bună parte din determinanţii specificităţii antigenice ai celulei, formînd antigenul „O" sau polizaharidul „O".

Structura lipopolizaharidului bacterian este tipică la celulele aparţinînd variantelor „S" („smooth") care produc colonii cu aspect neted; variantele „R" care produc colonii cu aspect rugos nu au polizaharid „O" şi au de cele mai multe ori o porţiune „R" incompletă (Wright şi Tipper, 1977).

Formula generală a lipopolizaharidului bacterian este următoarea:



Polizaharid „O" Porţiunea centrală „R"

Polizaharidul specific O (regiunea I a lipopolizaharidului) are o structură de bază simplă, alcătuită din secvenţe oligozaharidice repetate care conţin, de obicei, 2—4 componenţi monozaharidici. Au fost izolate monozaharide foarte diferite ca: 4-aminopentoza, manoza, ramnoza, galactoza, 2-aminohexoze, 6-dezoxihexoze, 3,6-didezoxihexoze etc.

P o l i z a h a r i d u l O de la *Salmonella typhimurium* (fig. 128) constă din unităţi tetrazaharidice repetate, care conţin D-galactoză, D-manoză, o dezoxihexoză (L-ramnoză) şi o didezoxihexoză. Didezoxihe-

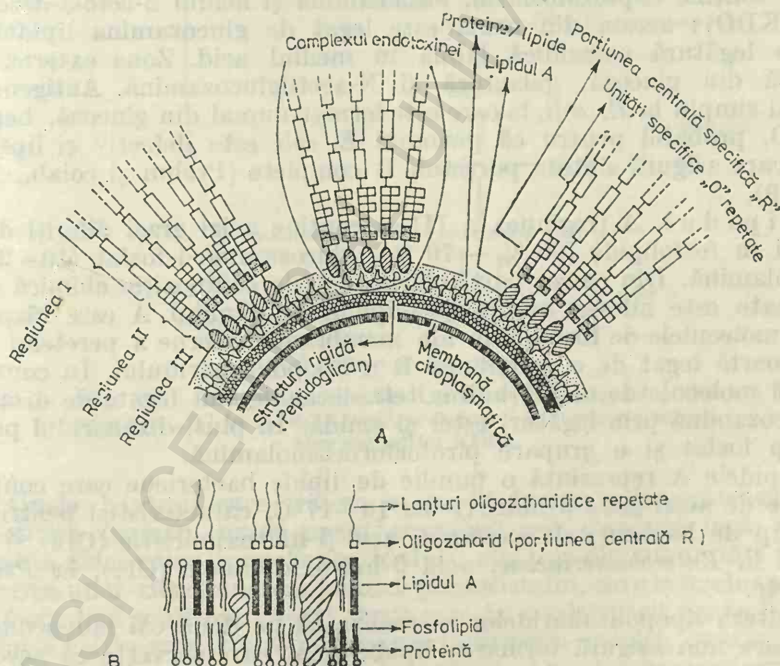


Fig. 128. — A. Perete celular de *Salmonella* prezentînd structura lipopolizaharidului. B. Detaliu evidenţiind relaţiile lipopolizaharidului cu membrana externă a peretelui celular (după Westphal, 1974).

xozele sînt zaharuri care nu există în natură, dar care intră frecvent în structura polizaharidului O al enterobacteriaceelor. Ele sînt cunoscute sub denumiri corespunzătoare speciilor de la care provin ca: tyveloză (3,6-dide-

zoxi-D-manoză) la *S. typhi*, colitoză (3,6-didezoxi-L-galactoză) la *E. coli* și abequoză (*la S. abortus*) sau paratoză (3,6-didezoxi-D-glucoză) la *S. paratyphi*. Structura chimică a polizaharidului este complicată prin substituiri la nivelul unităților repetate cu grupări glicozilice adiționale sau, în unele cazuri, cu grupări acetil, ceea ce duce la apariția variațiilor structurale mai subtile. Compoziția în zaharuri și secvența acestora, diferite de la o specie la alta și chiar în cadrul speciei, determină specificitatea antigenică sau serologică a bacteriilor respective și permite gruparea lor într-un număr de serotipuri (diferențiate serologic) și respectiv chemotipuri (diferențiate biochimic) pe baza similarității în compoziția chimică a antigenului O. Antigenul O acționează și ca situs receptor specific pentru fag.

Porțiunea R centrală a lipopolizaharidului (regiunea a II-a), este aproape identică la toate salmonelele studiate, dar diferită de *E. coli* și *Shigella*. A fost cel mai bine studiat la *S. typhimurium*, la care are structura unui polizaharid complex care conține N-acetil-D-glucozamină, D-glucoză, D-galactoză și doi constituenți neobișnuiți, un zahăr cu 7C, L-glicero-D-manoheptoză și un zahăr acid 3-dezoxi-manooctulosonat, abreviat inițial KDO (de la 2-ceto-3-dezoxioctonat).

Porțiunea R a lipopolizaharidului este divizată în două zone. Zona internă conține heptozofosfatul, etanolamina și acidul 2-ceto-3-dezoxioctonic (KDO); acesta din urmă este legat de glucozamina lipidului A printr-o legătură cetozidică labilă în mediul acid. Zona externă este compusă din glucoză, galactoză și N-acetilglucozamină. Antigenul R este mai simplu la *E. coli*, la care este format numai din glucoză, heptoză și KDO, probabil pentru că genomul *E. coli* este defectiv și lipsit de genele care asigură sinteza porțiunii R complete (Prehm și colab., 1975) (fig. 129).

Lipidul A (regiunea a III-a) conține acizi grași diferiți de cei prezenți în fosfolipide (60 % — 70 %), glucozamino-4-fosfat (10—20 %) și etanolamină. Din cauza particularităților de compoziție chimică și de solubilitate este adesea numit glicolipidul A. Lipidul A este răspîndit printre moleculele de fosfolipide ale membranei externe a peretelui celular și poartă legat de el porțiunea R a lipopolizaharidului. În constituția sa, 6 molecule de acid 3-hidroxitetradecanoic sînt legate de dizaharidul glucozamină prin legături ester și amidă. În plus, dizaharidul poartă un grup fosfat și o grupare pirofosforiletanolamină.

Lipidele A reprezintă o familie de lipide bacteriene care conțin o varietate de acizi grași β-hidroxi- cu 10—17 C, caracteristici pentru fiecare grup de bacterii: de exemplu, acid β-hidroximiristic (C14) și acid palmitic la *Enterobacteriaceae*, acid β-hidroxidecanoic (C10), la *Pseudomonas* etc.

Sinteza lipopolizaharidelor se realizează pe două căi independente, dintre care una asigură formarea lipidului A, care servește ca acceptor pentru adăugarea treptată a polizaharidului din porțiunea R, la care se adaugă polizaharidul specific O, preasamblat. După formare, lipopolizaharidul este rapid și ireversibil translocat în membrana externă. Translocația se poate realiza la situsuri definite de export, vizibile la celulele plasmolizate sub forma situsurilor de adeziune între membrana externă și membrana internă, deși ulterior lipopolizaharidul este dispersat la întîmplare în membrana externă.

Lipopolizaharidele sînt răspunzătoare de multe dintre proprietăţile biologice ale bacteriilor Gram-negative. Specificitatea serologică a celulelor bacteriene este conferită, în esenţă, de porţiunea variabilă polizaharidică, care corespunde antigenului O al acestor bacterii. Acest antigen acţionează şi ca situs specific receptor pentru anumiţi fagi. Lipidul A este răspunzător de proprietăţile endotoxice ale lipopolizaharidului şi conferă endotoxinelor bacteriene caracterul de termostabilitate.

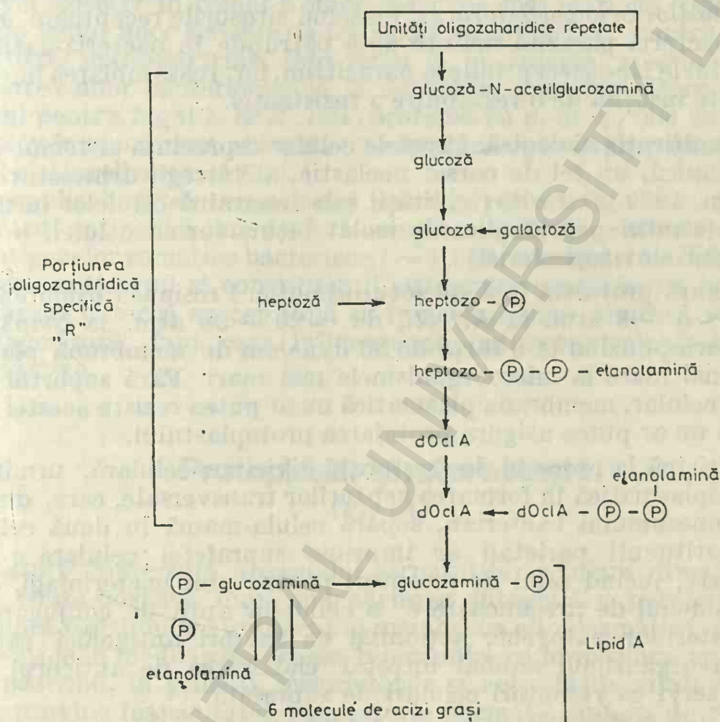


Fig. 129. — Compoziţia lipidului A şi a porţiunii oligozaharidice specifice „R" la *E. coli* (dOclA = 3-dezoxi-D-monooctulosonat, abreviat iniţial KDO).

Unele bacterii care trăiesc în medii foarte aglomerate sau înalt competitive (rumen, unele medii acvatice) pot prezenta încă *un strat extern* (în afara zonei lipopolizaharidului), alcătuit din subunităţi proteice sub forma unor sfere, cu aranjament paracristalin, care la unele specii formează straturi multiple. Acest strat, care la unele specii poate fi polizaharidic şi foarte gros, are rolul de a mări protecţia celulei, prin îngroşarea peretelui celular cu straturi suplimentare. La alte bacterii, straturile externe ale învelişurilor celulare sînt formate din şiruri regulate, caracteristice, de subunităţi de structură.

La bacteriile Gram-pozitive au fost evidenţiate astfel de structuri cu simetrie tetragonală sau hexagonală la genurile *Bacillus* şi *Clostridium*, situate pe suprafaţa peretelui celular, nu pe exospori şi pe învelişurile sporale colorabile intens cu osmiu (Thorney şi Glauert, 1974).

La bacteriile Gram-negative, structurile formate din subunități aranjate simetric sînt situate pe suprafața membranei externe, acoperind întreaga suprafață a celulei și par să fie mult mai frecvente la bacteriile care trăiesc libere în natură în raport cu cele parazite. Aceasta sugerează că ar putea avea o funcție protectoare, analogă celei de la capsida virală. La *Bacillus sphaericus*, stratul tetragonal acționează ca situsuri receptoare pentru bacteriofagul specific (Howard și Tipper, 1973), în timp ce la *Spirillum serpens* conferă rezistență față de infecția și parazitismul cu *Bdellovibrio bacteriovorus*, mascînd situsurile receptoare pe care se fixează bacteria parazită înainte de a pătrunde în bacteria-gazdă. Îndepărtarea lui le face susceptibile la parazitism, iar reasamblarea pe suprafața celulei este însoțită de o restabilire a rezistenței.

Semnificație biologică. Peretele celular reprezintă sistemul de susținere mecanică, un fel de corset neelastic, al întregii arhitecturi celulare (Costerton, 1979.) Datorită rigidității sale determină celulelor forma caracteristică (stratul peptidoglicanic izolat reține forma celulei, în timp ce protoplaștii sînt toți sferici).

Asigură protecția față de șocul osmotic. Presiunea osmotică internă este de $\sim 5 - 6$ atm. la *E. coli*, de $\sim 20 - 30$ atm. la *Staphylococcus aureus* (corespunzînd la o forță de 30 dyne/cm de membrană plasmatică) și mult mai mare la microorganismele mai mari. Fără suportul rigid al peretelui celular, membrana plasmatică nu ar putea rezista acestei presiuni interne și nu ar putea asigura protejarea protoplastului.

Participă la procesul de creștere și diviziune celulară, urmînd membrana citoplasmatică în formarea septurilor transversale, care, după replicarea cromosomului bacterian, separă celula-mamă în două celule-fiice. Unii constituenți parietali ar imprima suprafeței celulare o anumită specificitate, jucînd rolul de receptori pentru unii bacteriofagi, determinînd fenomenul de „recunoaștere" a celulelor apte de conjugare sau, în cazul bacteriilor patogene, acționînd ca factori antigenici capabili să inducă în organismul animal infectat elaborarea de anticorpi specifici care pot servi ca receptori celulari de suprafață.

Conține enzime autolitice capabile să atace structura glicopeptidului, active în momentul sporulării, al eliberării sporului prin liza sporangelui, al germinării, ca și în biosinteza peretelui celular și în reglarea acestui proces.

La bacteriile Gram-negative, prezența membranei externe și a constituenților ei conferă bacteriilor respective proprietăți deosebite în raport cu mediul înconjurător. Ea acționează ca o barieră impermeabilă pentru moleculele hidrofobe, împiedicînd intrarea în celulă a diferitelor substanțe potențial nocive și pierderea unor metaboliți necesari. Funcția sa de „sită moleculară" asigură trecerea unor oligopeptide, a oligozaharidelor și a unor substanțe hidrofile cu g.m. de ~ 700 daltoni (Nakae și Nikaido, 1975). Această funcție de transport pasiv este mediată de molecule proteice transmembranare, numite *porine*, care formează adevărate canale moleculare prin membrana externă. Ele sînt identice cu proteinele de matrice (Rosenbusch, 1974) și sînt asociate necovalent cu peptidoglicanul. Expunerea lor pe suprafața externă a bacteriilor este evidențiată prin faptul că acționează și ca receptori de fag (Hofstra și Dankert, 1981).

Membrana externă reţine în spaţiul periplasmic enzimele degradative sintetizate în celulă, după ce au traversat membrana plasmatică, precum şi o largă varietate de molecule nutritive. Prin această funcţie, activităţile enzimatice esenţiale pentru celulă, dar potenţial dăunătoare pentru constituenţii citoplasmatici, au loc în afara membranei plasmatice, iar degradarea moleculelor nutritive mari la monomeri simpli este efectuată în apropierea proteinelor de legare şi a permeazelor specifice care permit transportul selectiv în celulă a unor molecule mai mari de 700 daltoni.

Ea este sediul unor sisteme de transport specifice (ex. pentru vitamina B_{12}, maltoză, maltodextrine, ioni ferici şi nucleozide) şi este implicată în înglobarea unor bacteriocine şi în adsorbţia unor fagi. Spre exemplu, receptorul pentru fagul λ la *E. coli* (proteină cu g. m. 55 000 dal), localizat exclusiv în membrana externă, este implicat şi în transportul maltozei (Randall şi Hazelbauer, 1973).

Lipopolizaharidele membranei externe poartă un mare număr de determinanţi antigenici care conferă complexitatea şi specificitatea antigenică a antigenelor somatice bacteriene ($\sim$1 000 serotipuri la *Salmonella*). Ele fixează anticorpii şi constituenţii sistemului complement la distanţă de membrana externă susceptibilă şi, în acelaşi timp, diminuă sensibilitatea la fagocitoză, fapt care influenţează indirect virulenţa bacteriilor Gram-negative.

Protoplaştii şi sferoplaştii
(Pl. 54)

Protoplastul*) reprezintă ansamblul structurilor celulare rămase dintr-o bacterie Gram-pozitivă după îndepărtarea integrală a peretelui celular sub acţiunea lizozimului. Îmbrăcat în membrana citoplasmatică, protoplastul se menţine în medii izotonice sau hipertonice ca formaţiune aproximativ sferică, păstrînd, în general, proprietăţile şi activităţile vitale ale celulei din care provine (capacitatea respiratorie normală, sinteza de proteine şi de acizi nucleici, viabilitatea în culturi şi, în anumite condiţii, chiar capacitatea de diviziune şi aptitudinea de a asigura multiplicarea fagului al cărui acid nucleic se găsea deja în celulă în momentul pierderii peretelui celular). El nu mai este însă capabil de a reface prin sinteză peretele celular dacă acesta a fost complet îndepărtat. Funcţia de barieră osmotică, asigurată de membrana citoplasmatică, este însă mult mai labilă în lipsa protecţiei conferite de peretele celular rigid şi, ca urmare, în medii hipotonice protoplastul se lizează.

Este probabil ca formaţii similare să se găsească şi în condiţii naturale, la marginea coloniilor bătrîne, în lacuri şi alte ape, unde ar putea supravieţui, în anumite condiţii, cu toată fragilitatea lor.

*) Wyssling (1976) critică denumirea de *protoplast*, consacrată prin uz în microbiologie, deoarece în sens biologic protoplastul reprezintă în general totalitatea constituenţilor celulei vii, indiferent dacă aceasta este sau nu acoperită de un perete. El preferă de aceea denumirea de *gimnoplast* (folosită în botanică) pentru a desemna protoplastul nud, în contrast cu *dermatoplastul* (celula vegetală normală cu perete celular), iar pentru *sferoplast* recomandă denumirea de *semigimnoplast*.

La bacteriile Gram-negative, peretele celular nu poate fi degradat complet, astfel că tratarea cu lizozim îi slăbeşte numai structura prin degradarea selectivă a mucocomplexului. În medii hipotonice, celula astfel tratată se lizează, iar în medii hipertonice se transformă în *sferoplast*, corp sferic echivalent unui protoplast, înconjurat de constituenţii peretelui celular care au rezistat la acţiunea lizozimului.

Protoplaştii aparţinînd unor specii diferite de bacterii (spre exemplu, mutante poliauxotrofe de *B. megaterium* şi *B. subtilis)* fuzionează în prezenţa unor substanţe ce acţionează ca agenţi de fuzionare, producînd formarea de bacterii bi- sau multinucleate care în cursul reversiei la forma bacilară (prin refacerea peretelui celular) sau ulterior, într-o perioadă scurtă de timp, duc la apariţia unor bacterii cu genotip haploid, modificat prin recombinare genetică cu caractere provenind de la cele două celule originare (Schaeffer, 1976 ; Fodor şi Alföldi, 1976).

Spaţiul periplasmic

Spaţiul periplasmic sau zona periplasmică este un compartiment întîlnit numai la bacteriile Gram-negative, delimitat spre interior de membrana citoplasmatică, iar spre exterior de un strat care acţionează ca o sită moleculară, corespunzînd membranei externe a peretelui celular (Mitchell, 1961). În felul acesta, spaţiul periplasmic şi complexul peptidoglican—lipoproteină ocupă aceeaşi zonă a peretelui celular, în care primul adăposteşte constituenţii periplasmici, iar celălalt susţine şi întăreşte învelişurile celulei (fig. 130).

La *E. coli*, spaţiul periplasmic conţine fosfatază alcalină, acidhexozofosfatază, fosfodiesterază ciclică şi numeroase enzime hidrolitice, fosfataze, DNaze, RNaza I, penicilinaze etc.

Pe lîngă numeroase enzime implicate în nutriţie, spaţiul periplasmic conţine o serie de proteine specifice, neenzimatice, „proteine de legare", care leagă specific anumite substanţe (zaharuri, aminoacizi, ioni anorganici) transportîndu-le pînă la nivelul proteinelor de transport legate de membrană. Aceste proteine pot fi eliberate uşor din celule, prin şoc osmotic (diluţia rapidă a suspensiilor celulare hipertonice — sucroză 0,5 M — după tratament cu EDTA). Cu ajutorul anticorpilor cuplaţi cu feritină s-a demonstrat că proteinele spaţiului periplasmic sînt răspîndite difuz sau concentrate în „bonete" polare în zone în care acest spaţiu este mărit.

Semnificaţie biologică. Membrana externă a peretelui celular lasă să treacă în regiunea periplasmatică numeroase substraturi hidrofile (echivalente cu tetra- şi pentamere de aminoacizi, dimeri şi trimeri de carbohidraţi) (Sokatch, 1977). Funcţia principală a enzimelor periplasmice (fosfataze, sulfataze, amidaze etc.) este de a pregăti chimic substanţele care difuzează prin membrana externă pentru trecerea lor prin membrana plasmatică în citoplasmă. Prin acest mecanism, enzimele degradative acţionează pe o largă varietate de substraturi întîlnite în natură de bacteriile Gram-negative, care difuzează pînă în această zonă a peretelui celular unde sînt convertite în molecule transportabile în celulă, imediat accesibile proteinelor de legare şi permeazelor. Prezenţa enzimelor degradative

în asociere foarte strînsă cu peretele celular face ca produșii rezultați din acțiunea lor, în imediata apropiere a permeazelor, să nu se piardă în mediu și să fie imediat preluați de sistemele de transport și folosiți în metabolism, conferind astfel bacteriilor Gram-negative un deosebit avan-

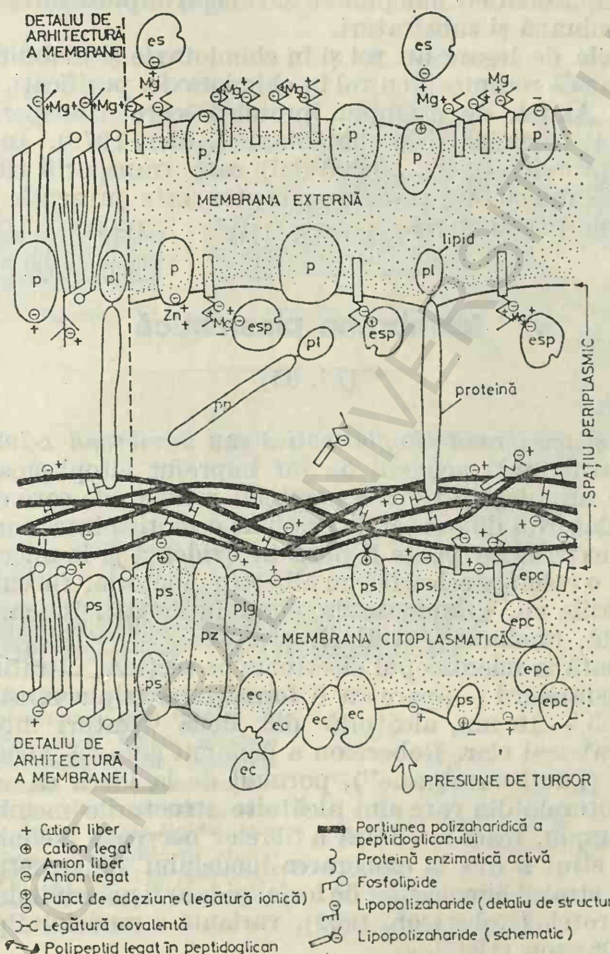


Fig. 130. — Spațiul periplasmic. Raporturile sale cu structura moleculară a membranei plasmatice, a peretelui celular și a membranei externe a bacteriilor Gram-negative (după Costerton, Ingram și Cheng, 1974). plg, proteină de legare; ec, enzime membranare active în citoplasmă; epc, enzime de sinteză a peretelui celular; esp, enzimele spațiului periplasmic; es, enzime localizate la suprafața celulei; pl, porțiunea lipidică a lipoproteinei; p, proteine structurale și enzimatice ale membranei externe; pp, porțiunea proteică a lipoproteinei; pz, permeaze; ps, proteine structurale ale membranei plasmatice.

taj biologic. De aceea, bacteriile adaptate la viață în mări, rîuri, lacuri etc. sînt în majoritatea lor Gram-negative (Costerton și colab., 1974).

Spre deosebire de bacteriile Gram-negative, cele Gram-pozitive eliberează cea mai mare parte din enzimele lor extracelular, în mediu.

Acest mecanism este avantajos pentru bacteriile care trăiesc în condiţii de mare concentraţie de substrat şi de mare densitate populaţională, deoarece produşii de digestie ai enzimelor extracelulare, neasociaţi cu peretele celular, sînt accesibili tuturor celulelor aflate în vecinătatea locului lor de producere. Unele proteine periplasmice (de ex., proteinele de legare şi citocromii periplasmatici) îndeplinesc şi funcţia de purtători între enzimele legate de membrană şi substraturi.

Proteinele de legare au rol şi în chimiotaxie şi mobilitate, deoarece s-a demonstrat că receptorii cu rol în chimiotaxie, purificaţi, sînt proteine periplasmice. Astfel, de exemplu, proteina care transportă galactoză (Siluvay, 1974) participă şi în chimiotaxie (Adler, 1979). În mod similar se comportă proteina (g. m. 30 000 dal) care transportă riboza (Zukin, 1977). Fiecare din aceste proteine-receptor este prezentă în număr de $\sim 10^4$ molecule per bacterie.

Membrana plasmatică

(Pl. 55)

Numită încă şi *membrană citoplasmatică* sau *membrană celulară*, această formaţiune structurală acoperă de jur împrejur citoplasma bacteriană, separînd-o de suprafaţa internă a peretelui celular, de care este de obicei strîns lipită, datorită diferenţei de presiune osmotică între conţinutul celular şi mediul extern. Ea poate fi pusă în evidenţă şi la microscopul fotonic, fie după o colorare selectivă cu albastru Victoria, fie chiar fără colorare, la bacteriile vii, examinate în cîmp întunecat, în care caz apare ca o linie netă, luminoasă, strălucitoare.

Examinată la microscopul electronic pe secţiuni ultrafine — în condiţii tehnice standard — apare ca o formaţiune triplu stratificată, cu o grosime de 7,5 — 10 nm, alcătuită din două straturi întunecate care separă un strat mai clar. Robertson a denumit această structură *unitate de membrană* („unit-membrane"), pornind de la ideea că ea reprezintă unitatea structurală din care sînt alcătuite structurile membranare complexe (de exemplu, teaca mielinică a fibrelor nervoase medulare). Aspectul de triplu strat a dus la elaborarea modelului de structură greşit, în acord cu care stratul bimolecular de fosfolipide ar fi mărginit de fiecare parte de un strat proteic (Robertson, 1969), variantă a modelului propus iniţial de Danielli-Dawson (1935).

Arhitectura moleculară. Modelul de structură propus de Robertson a fost infirmat pe baza a numeroase fapte de observaţie: 1) membranele plasmatice conţin o cantitate insuficientă de proteine pentru a acoperi complet ambele părţi ale stratului lipidic; 2) proteinele de membrană au configuraţie globulară (plisată), nu extinsă, şi sînt amfipatice (posedă pe suprafaţa lor atît regiuni polare, cît şi regiuni nepolare; 3) unele proteine sînt situate pe suprafaţa dublului strat lipidic, în timp ce altele sînt inclavate în el sau îl străbat integral; 4) examinarea la microscopul electronic a membranelor plasmatice de *E. coli*, după tehnica de îngheţare — fracturare („freeze-etching"), a evidenţiat scindarea unei foiţe interne con-

vexe, situată spre partea citoplasmatică a membranei, care poartă pe suprafaţa sa numeroase structuri bombate, ca nişte ţinte cu ∅ 5 — 10 nm, uniform distribuite, corespunzînd proteinelor enzimatice care traversează membrana (Staehlin, 1974). Totodată, se evidenţiază foiţa externă a membranei, adiacentă stratului de peptidoglican, pe suprafaţa căreia se văd o serie de depresiuni (fig. 131).

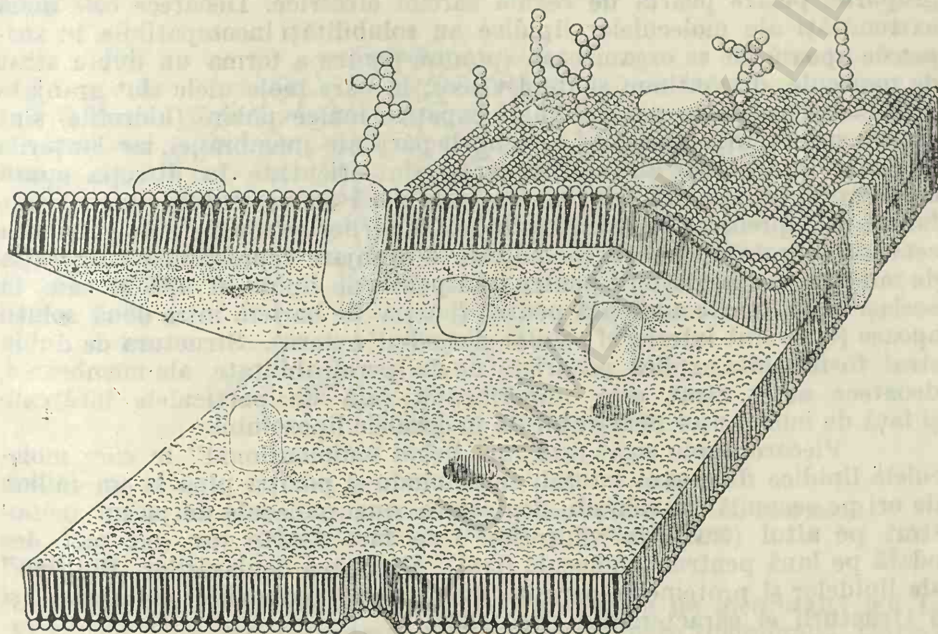


Fig. 131. — Evidenţierea structurii interne a membranei plasmatice, prin tehnica de îngheţare-fracturare de-a lungul planului central al stratului dublu lipidic. Jumătate din membrană rămîne asociată cu citoplasma. Sînt expuse proteinele globulare, normal inclavate în stratul dublu lipidic, care apar ca protuberanţe răspîndite pe suprafaţa netedă a fiecărei jumătăţi de membrană (reprezentare schematică după Staehlin şi Hull, 1979).

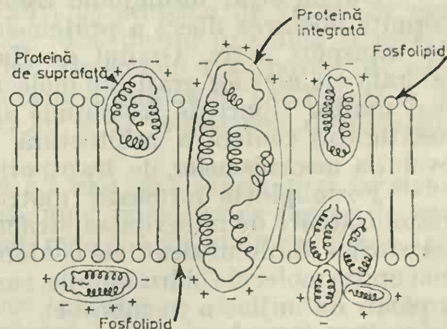


Fig. 132. — Structura moleculară a membranei plasmatice — modelul mozaicului fluid.

Modelul de structură acceptat în unanimitate — *modelul mozaicului fluid* (Singer-Nicolson, 1972) — propune o aşezare caracteristică a componentelor specifice ale membranei reprezentate de lipide, proteine şi glucide în acord cu proprietăţile lor, satisfăcînd exigenţele termodinamice şi furnizînd o explicaţie satisfăcătoare a proprietăţilor generale ale biomembranelor (fig. 132). După acest model, fosfolipidele formează un film fluid, discontinuu, în care „plutesc" proteinele globulare, în timp ce glucidele interacţionează fie cu unele, fie cu altele.

Lipidele sînt reprezentate de fosfolipide — molecule amfipatice cu structură complexă, avînd o extremitate polară, hidrofilă (hidrosolubilă în stare izolată), alcătuită dintr-o grupare fosfat (PO_4^-) şi alţi constituenţi, legaţi printr-o moleculă de glicerol — care formează un fel de punte de „cozile" moleculei, reprezentate de doi acizi graşi, ce constituie regiunea nepolară, hidrofobă (insolubilă în apă) a moleculei*). În contact cu apa, grupările polare poartă de regulă sarcini electrice. Deoarece cele două extremităţi ale moleculelor lipidice au solubilităţi incompatibile, în suspensie apoasă ele se organizează spontan pentru a forma un dublu strat de molecule, discontinuu şi fluid-vîscos, în care moleculele sînt aranjate „coadă-la-coadă" în aşa fel încît capetele ionice polare (hidrofile) sînt expuse spre soluţia apoasă — de ambele părţi ale membranei, iar lanţurile nepolare (hidrofobe) ale acizilor graşi sînt orientate în direcţia opusă contactului cu apa. În felul acesta, cele două monostraturi de molecule formează împreună, două straturi hidrofile periferice separate de porţiunea centrală hidrofobă. Această modalitate de aranjare reprezintă configuraţia de minimă energie posibilă pentru o suspensie de lipide în apă şi este, în acelaşi timp, foarte adecvată pentru funcţia de barieră între două soluţii apoase (cum sînt interiorul celulei şi mediul extern). Structura de dublu strat fosfolipidic explică proprietăţile de permeabilitate ale membranei, deoarece acest strat este impermeabil faţă de particulele încărcate şi faţă de ioni şi uşor penetrabil de moleculele liposolubile.

Fiecare dublu strat este un „lichid bidimensional" în care moleculele lipidice difuzează lateral, schimbîndu-şi poziţia pînă la un milion de ori pe secundă. În schimb, deplasarea unei molecule de pe un monostrat pe altul (tranziţia „flip-flop") se face foarte rar (cel mai des odată pe lună pentru o moleculă dată). Raritatea deplasărilor „flip-flop" ale lipidelor şi proteinelor permite menţinerea compoziţiei membranei şi a structurii ei caracteristice (fig. 133).

Dublul strat fosfolipidic trebuie să fie suficient de fluid pentru a permite mişcarea liberă a proteinelor membranare implicate în procesele de transport activ. Gradul de fluiditate depinde de natura lanţurilor laterale ale acizilor graşi din moleculele fosfolipidice. În general, prezenţa mai multor tipuri de fosfolipide diferite (în special cu lanţuri laterale nesaturate) conferă o arhitectură moleculară mai fluidă care facilitează evoluţia mecanismelor de transport activ prin biomembrane.

Fosfolipidele formează matricea structurală a membranei şi sînt răspunzătoare de integritatea structurală a acesteia. Prin structura caracteristică a dublului strat, ele conferă membranei impermeabilitatea la cele mai multe molecule hidrosolubile, care sînt insolubile în regiunea „uleioasă" a părţii de mijloc a membranei.

Proteinele, în raport cu poziţia lor în structura membranei, sînt de două tipuri:

Proteinele integrate (intrinsece, „integral proteins"), în general insolubile, în apă, nu pot fi îndepărtate fără ruperea dublului strat lipidic. Au o orientare fixă: fiecare proteină de acelaşi tip este îndreptată în aceeaşi direcţie. Cele mai multe străbat toată grosimea membranei celulare („proteine transmembranare"), dar unele pot fi expuse fie numai

*) Spre deosebire de celulele eucariote, membrana bacteriilor — cu excepţia genului *Mycoplasma*— nu conţine colesterol.

pe suprafaţa internă (citoplasmatică), fie spre suprafaţa externă. Regiunile lor dirijate spre interior şi/sau spre exterior au caracter hidrofil, ceea ce împiedică tranziţia lor de tip „flip-flop".

Proteinele de suprafaţă (periferice sau extrinsece), neinserate în dublul strat lipidic, sînt în general hidrosolubile şi situate fie pe suprafaţa internă, fie pe cea externă, de regulă legate de proteinele integrate.

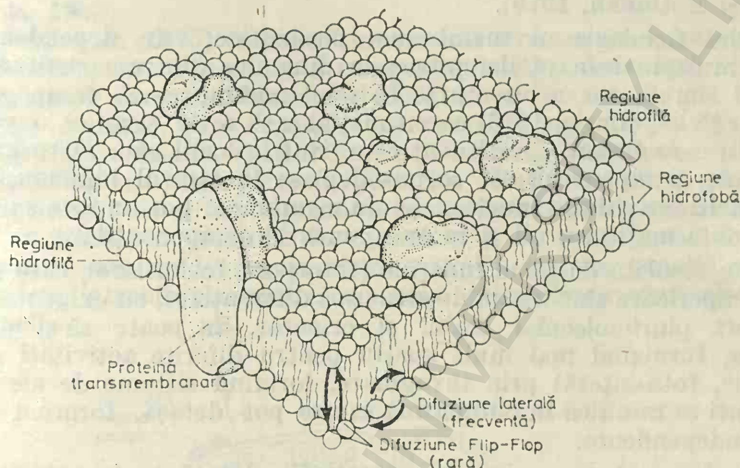


Fig. 133. — Membrana plasmatică — reprezentare schematică a unui model tridimensional (după Lodish şi Rothman, 1979).

Din punct de vedere funcţional, proteinele de membrană pot fi: 1) enzime care fac biosinteza învelişurilor celulare (membrană plasmatică, polimeri parietali şi extraparietali); 2) proteine de transport care asigură transferul moleculelor solubile din mediu în celulă şi invers; 3) citocromi şi alte proteine aparţinînd sistemului transportor de electroni; 4) proteine cu activitate adenozintrifosfatazică (ATP-aza) şi 5) proteine implicate în turnover-ul lipidelor şi al proteinelor membranare (fosfolipaze, proteaze şi peptidaze).

Glucidele reprezintă componentul cel mai slab reprezentat în structura membranei şi se găsesc sub forma unor polizaharide legate de proteine (glicoproteine) sau interacţionînd puternic cu anumite lipide (glicolipide).

Semnificaţie biologică. Membrana plasmatică reprezintă singura suprastructură citoplasmatică permanentă a celulei bacteriene, avînd rolul de a delimita spaţiul intracelular. Ea formează un compartiment închis, dar nu reprezintă o graniţă fizică inertă a celulei, ci o structură funcţională capabilă să asigure o deosebire netă între interiorul şi exteriorul acesteia. Această proprietate este consecinţa faptului că membrana plasmatică prezintă o asimetrie funcţională, cu importanţă esenţială pentru viaţa celulei, în sensul că suprafaţa internă funcţionează diferit de cea externă. Altfel, un ion sau o moleculă pompată la interior printr-un punct al membranei ar putea fi eliminat în altul cu o cheltuială inutilă

de energie. Această asimetrie funcţională are la bază o asimetrie de structură moleculară, manifestată pe mai multe căi : 1) cele două monostraturi lipidice includ proporţii variate ale diferitelor tipuri de molecule lipidice; 2) carbohidraţii sînt prezenţi numai pe suprafaţa externă a membranei, în timp ce proteinele periferice sînt situate aproape întotdeauna pe faţa internă; 3) fiecare tip de proteină integrată are o orientare definită, care este aceeaşi pentru fiecare moleculă de acelaşi tip (Lodish şi Rothman, 1979).

Rolul fiziologic al membranei plasmatice este dependent într-o măsură mult mai mare de procesele dinamice dintre constituenţii săi decît de simpla lor arhitectură. În felul acesta, ea se comportă ca o „structură vie" (Luria, 1973) care funcţionează activ şi nu ca o structură statică, în care fiecare constituent este fixat la locul său. Datorită structurii fluide, componenţii săi se pot deplasa în stratul bidimensional în aşa fel încît activităţile funcţionale ale membranei pot implica modificări atît în conformaţia sa, cît şi în aranjamentul componenţilor.

Este asociată cu toate funcţiile (transport, fosforilare), care la organismele superioare sînt legate de structuri diferenţiate, cu exigenţe pentru un suport plurimolecular stabil şi orientat. Ea poate să-şi mărească suprafaţa, furnizînd mai mult spaţiu pentru diferite activităţi celulare (respiraţie, fotosinteză) prin invaginare, formînd sisteme de membrane, care uneori se ramifică în citoplasmă sau se pot detaşa, formînd entităţi virtual independente.

Funcţionează ca o „barieră osmotică", dotată cu impermeabilitate cvasitotală faţă de multe tipuri de molecule, permiţînd trecerea nestînjenită a altora. Ea asigură în acest fel schimburile necesare şi selective între mediul extern şi cel intracelular, menţinînd constantă compoziţia chimică şi ionică a celulelor, care, la rîndul lor, influenţează critic numărul enorm de reacţii interdependente ce au loc în citoplasmă. Proprietăţile de permeabilitate ale membranei plasmatice pot fi sintetizate astfel : a) substanţele uşor solubile în solvenţii lipidelor, ca şi unii anioni (ex. Cl^-) traversează uşor biomembranele; b) unii ioni, ca Na^+, K^+, glucidele şi proteinele, nu o pot traversa uşor, celula recurgînd la mecanisme speciale de transport.

Membrana plasmatică bacteriană şi structurile derivate din ea formează baza structurală a sinergonului fotosintezei şi a celui respirator, reprezentînd prin aceasta un echivalent funcţional al cloroplastelor, respectiv al mitocondriilor din celulele eucariote. Ea este implicată în mobilitatea bacteriană, datorită faptului că una din structurile corpului bazal al flagelului este strîns legată de structura sa.

În plus, unele proteine legate de membrană sau aflate în contact lax cu ea (fiind localizate în spaţiul periplasmatic) joacă rolul de chemoreceptori.

Participă la formarea şi eliminarea unor proteine, ca enzimele şi exotoxinele, care pot fi sintetizate în membrana plasmatică sau pe suprafaţa ei externă. În primul caz, trecerea lor extracelular s-ar realiza fie printr-un mecanism de tipul pinocitozei inverse, fie datorită unei porţiuni glucidice legate, care ar facilita eliberarea. În al doilea caz, moleculele sintetizate ar difuza liber în mediu.

Mezosomii

(Pl. 56)

Mezosomii (Fitz—James, 1967) au fost descrişi iniţial sub denumiri diferite: *membrane intracitoplasmatice* (Hopwood, 1960), *corpi periferici* (Chapman, 1953), *condrioizi* (Van Iterson, 1961) sau *plasmalemasomi* (Edwards, 1963).

Greenawalt (1975) consideră mezosomii structuri membranare intracitoplasmatice, caracterizate prin trei particularităţi definitorii: 1) derivă ultrastructural din membrana celulară ca o invaginare în formă de „sac" sau „pungă", care conţine corpi membranoşi; 2) pot fi extrudaţi din sacul mezosomal în spaţiul dintre membrana plasmatică şi peretele celular prin agitare, îndepărtarea peretelui celular sau după plasmoliză; 3) sînt asociaţi fizic şi/sau topografic cu replicarea şi segregarea cromosomului, cu formarea septului de diviziune şi cu sporularea. Structurile membranare care nu întrunesc aceste condiţii trebuie numite *membrane intracelulare* (intracitoplasmatice) sau *structuri similare mezosomilor* („mesosome-like").

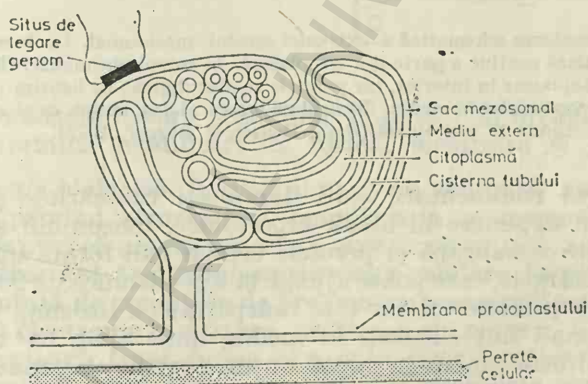


Fig. 134. — Structura schematică a mezosomului bacterian, evidenţiind modul de pătrundere a citoplasmei în structura acestuia, într-un spaţiu care nu este conectat nici cu cisternele tubulilor, nici cu mediul extern. Tubulii din sacul mezosomal apar pe secţiunea transversală circulari. Situsul de legare al genomului este localizat pe faţa citoplasmatică a sacului mezosomal (după Reusch şi Burger, 1973).

La microscopul electronic apar sub forma unor structuri cu formă, mărime, localizare şi complexitate foarte diferite, în general putînd varia nu numai în funcţie de starea fiziologică a celulei, ci şi de calitatea şi natura tehnicilor de prefixare şi fixare, precum şi de unghiul de secţionare (fig. 134).

Au fost descrise trei tipuri morfologice de mezosomi, după unii autori interconvertibile: *lamelari* (formaţi prin plierea membranei invaginate într-un aranjament în spirală încolăcită ca un ghem), *veziculari* sau *sacciformi* (vezicule aproape sferice) şi *tubulari* (de forma unor tubuşoare lungi), iar ca localizare: mezosomi *septali*, *periferici* şi *nucleari*.

Mezosomii au caracteristicile structurale ale membranei plasmatice din care derivă (structura triplustratificată şi grosimea de 7,5—8,0 nm). Sînt mai numeroşi şi mai bine dezvoltaţi la bacteriile Gram-pozitive, în timp ce la bacteriile Gram-negative sînt relativ mai greu de observat,

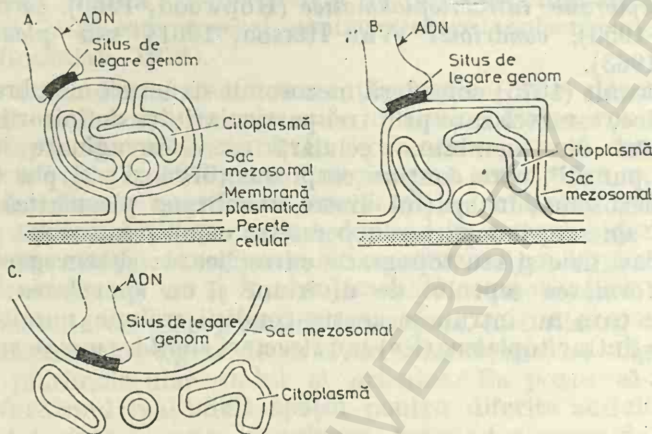


Fig. 135. — Reprezentarea schematică a extruziei sacului mezosomal. La începutul plasmolizei (A), o ramură tubulară conţine o parte din citoplasmă. În cursul plasmolizei (B), ramura se desprinde, păstrînd citoplasma în interior, iar peretele celular digerat de lizozim (C) permite eliberarea tubulilor şi a veziculelor în mediu. Situsul de legare al genomului, ca şi materialul genetic rămîn în protoplast (după Reusch şi Burger, 1973).

fiind în general rudimentari, slab dezvoltaţi ca mărime şi mai puţini ca număr. Prin expunere în medii hipertonice, mezosomii sînt extrudaţi în spaţiul dintre membrană şi peretele celular sub forma unor filamente, ca un şirag de mărgele, care poate ajunge la dimensiunea de 20nm (fig. 135). În cazul în care peretele celular este îndepărtat cu lizozim, veziculele sau tubulii mezosomali sînt eliberaţi în mediu, unde apar ca un „şirag de perle". Unele dintre „mărgele" apar cu un centru electrondens datorită fie pătrunderii colorantului, fie dispersării electronilor de materialul de natură citoplasmică închis în veziculă.

Originea, creşterea şi diferenţierea mezosomilor. Formarea mezosomilor este un proces complex, care începe cu invaginarea membranei plasmatice şi sfîrşeşte cu legarea de genomul bacterian; are loc în special în zona în care creşterea membranei se face mai repede decît a peretelui celular, ceea ce are drept consecinţă invaginarea acesteia sub forma unor „pungi" pline cu membrane (Rogers, 1970).

Invaginarea iniţială duce la formarea unui sac sferic, conectat cu membrana printr-un peduncul de lungime variabilă, deschis spre mediul extern şi/sau spaţiul periplasmic (fig. 135). Mezosomul simplu, sferic, suferă în continuare modificări rezultate din diferite grade de turtire însoţite de invaginări secundare, care duc la formarea de lamele, vezicule şi tubuli. În cazul în care complexitatea mezosomului creşte, dezvoltarea se face pe seama membranei nou sintetizate care se adaugă membranei invaginate. Concomitent cu creşterea în complexitate apare posibilitatea

unui grad mai mare de compartimentare a constituenţilor citoplasmatici, chiar în mezosomi, care apar la microscopul electronic sub forma unor canale rezultate din invaginările secundare. Printr-un mecanism similar se formează şi mezosomii lamelari.

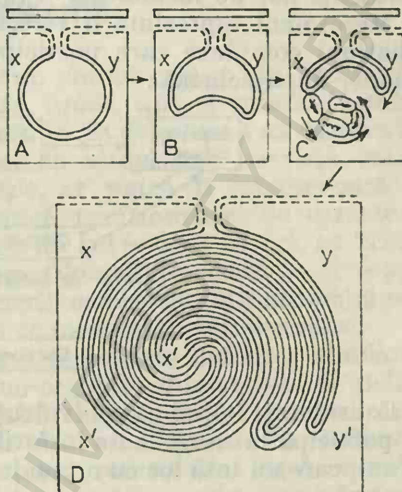


Fig. 136. — Reprezentarea schematică a stadiilor de formare a mezosomilor. A, B. Dezvoltarea unui mezosom sacular turtit dintr-un mezosom sferic (vezicular). X şi Y reprezintă punctele terminale ale sacului şi situsurile potenţiale de creştere ale membranelor intracelulare. Pentru simplificare, diagrama ilustrează numai dezvoltarea în punctul X printr-o secvenţă de săgeţi şi vezicule, deşi procesul are loc şi în punctul y (C). D. Mezosom cu structură complexă multilamelară, format prin creşterea şi plierea sacului turtit prin extinderea lui X la X′ şi a lui Y la Y′.

Nu se cunoaşte natura stimulilor implicaţi în invaginare şi nici a celor care determină modificări de formă, localizare şi complexitate.

Semnificaţie biologică. În ultimii ani s-au acumulat numeroase date contradictorii privind structura şi semnificaţia mezosomului, rezultînd probabil din faptul că acesta nu este o structură statică, ci un „organit" permanent influenţat de dinamica proceselor celulare. În plus, morfologia lui este influenţată de condiţiile de prelucrare permergătoare examinării la microscopul electronic (prefixare, calitatea şi natura fixării chimice etc.), care afectează tipul, forma şi poate chiar localizarea în celulă.

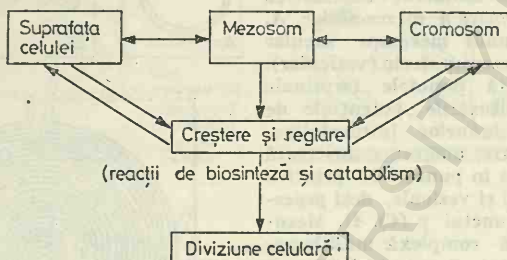
Consideraţi de unii autori ca structuri vestigiale sau redundante, mezosomii sînt structuri versatile şi multifuncţionale, neesenţiale pentru viabilitatea bacteriilor, avînd o deosebită plasticitate structurală, ca răspuns la nevoi specifice, variate.

Formarea lor reprezintă o modalitate prin care celula bacteriană are posibilitatea de a-şi mări, prin invaginare şi pliere, suprafaţa membranei plasmatice, ca răspuns la condiţiile de mediu. De aceea, se consideră că nu ar avea funcţii diferite sau suplimentare faţă de cele ale membranei plasmatice, în măsura în care acestea nu au fost încă descoperite.

Rolul mezosomilor în replicarea şi segregarea genomului bacterian a fost demonstrat pe baze morfologice, genetice şi biochimice. Fiind legat atît de membrana plasmatică, cît şi de materialul nuclear are un rol important în controlul replicării cromosomului şi al plasmidelor bacteriene, prin transmiterea semnalului biochimic care ia naştere la suprafaţa celulei. La *B. subtilis*, în faza iniţială, fiecare nucleosom este legat de un

mezosom, pentru ca pe măsură ce celula crește și se apropie de diviziune mezosomul să se dividă, iar formațiunile rezultate să migreze spre extremitățile celulei, antrenînd cromosomii bacterieni progeni. Forța care realizează această deplasare este reprezentată de sinteza și încorporarea de constituenți noi de membrană celulară.

Mezosomul reprezintă o verigă fizică și biochimică între diferitele interacțiuni complexe care participă, în ultimă instanță, la creștere și diviziune, după schema :



Considerați inițial ca echivalenți funcționali ai mitocondriilor, mezosomii participă la reacțiile de fosforilare, oxidoreducere și transport de electroni, care au însă loc cu o pondere mult mai mică decît în membrana plasmatică.

Conțin fosfataze acide, esteraze etc. și ar putea funcționa ca „organite" subcelulare degradative, asimilabile funcțional cu lizosomii din celulele eucariote (Revsch, 1972).

Au rol în unele procese secretorii ca, de exemplu, în producerea și eliberarea unor exoenzime ca „penicilinaza". Tulpinile bacteriene care nu produc penicilinază au un singur mezosom mare, dar după tratarea cu un inductor al sintezei enzimei (de ex., cefalosporina) apare un număr mare de mezosomi mici, tubulari sau veziculari, ca un adevărat aparat secretor.

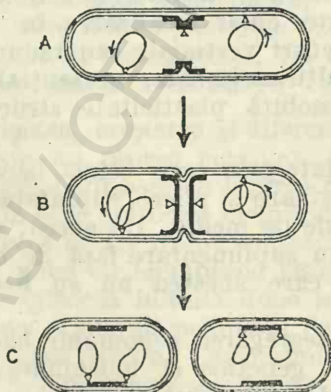


Fig. 137. — Rolul mezosomilor în segregarea materialului genetic în cursul diviziunii celulare. Cromosomii apar sub forma unor bucle ovalare, iar mezosomii ca triunghiuri. Zonele colorate în negru reprezintă părți din membrana plasmatică nou sintetizată. Se observă formarea septului (A și B), replicarea cromosomilor (B) și separarea lor (C) prin diviziunea mezosomilor și sinteza membranei.

Mezosomii ar fi implicați în sinteza învelișurilor celulare, în mod particular a membranei plasmatice, a peretelui celular și a septului transversal care separă celulele după diviziune (fig. 137). Tichy și Landman

(1969) consideră că ar reprezenta o regiune specializată prin care, în cursul transformării genetice, ADN transformant ar pătrunde în celulă.

Citoplasma

Citoplasma bacteriană este, în general, considerată ca un *sistem coloidal complex* format din proteine, glucide, lipide, apă şi substanţe minerale, sistem în care apa şi compuşii dizolvaţi în ea acţionează ca faza externă a unui sol (Lamanna, 1949). Deoarece în citoplasmă coexistă stările de coacervare, de emulsie şi de soluţie, ar putea fi caracterizată ca un complex de stări fizice într-o continuă transformare. Se caracterizează prin menţinerea permanentă a stării de gel — ceea ce are ca rezultat o imobilitate a conţinutului (lipsa curenţilor citoplasmatici)—şi reprezintă o condiţie indispensabilă a menţinerii nemiscibilităţii nucleului cu citoplasma, avînd în vedere absenţa unor membrane intracelulare.

Citoplasma bacteriană nu are o organizare definită, similară celei din celulele eucariote, care conţine organite diferenţiate şi delimitate de membrane. Aspectul ei este variabil în funcţie de vîrsta culturii şi de condiţiile de mediu. La celulele tinere şi în condiţii normale de dezvoltare, citoplasma aderă de peretele celular şi se prezintă ca o masă densă, omogenă şi intens colorabilă. La celulele bătrîne, citoplasma îşi pierde treptat afinitatea tinctorială, se retractă, centripet, îndepărtîndu-se de perete, şi capătă o structură granulară cu vacuole din ce în ce mai evidente la microscopul electronic. La bacteriile examinate pe secţiuni mai puţin fine ($\sim$50 nm), zona citoplasmatică apare ca fiind plină de agregate de ribosomi, aspect în mare măsură rezultat din suprapunerea acestor structuri cu $\varnothing$ de 10 nm. Dovada o constituie faptul că pe secţiuni extrem de subţiri, ca şi prin examinarea directă a planului de clivaj, după tehnica îngheţare-fracturare, cea mai mare parte a citoplasmei este amorfă şi lipsită de particule structurale, iar ribosomii sînt rari.

În interiorul citoplasmei se găsesc materialul nuclear, incluziunile, vacuolele şi ceilalţi constituenţi ai protoplastului.

Între particulele coloidale aflate în suspensie în citoplasmă şi lichidele intracelulare există o interdependenţă continuă şi un schimb permanent de diferiţi atomi şi molecule, o distribuţie variabilă de forţe electrice şi de atracţii chimice, şocuri fizice reciproce etc., toate procesele intracitoplasmatice evoluînd într-o stare de echilibru relativ stabil. Rezultatul acestor interferenţe intracelulare, la care se adaugă acela al schimburilor bilaterale dintre celulă şi mediu, este viaţa celulei cu toate manifestările ei de metabolism, creştere şi multiplicare. În cursul lor, celula bacteriană îşi reînnoieşte permanent structura, transformînd, prin degradare şi sinteză, substanţele nutritive difuzate din mediu în structuri complexe, specifice celulei vii.

O caracteristică a citoplasmei bacteriene este prezenţa unei mari cantităţi de ARN, ceea ce explică bazofilia ei intensă, mai evidentă la celulele tinere. Celulele moarte se colorează mai puţin intens, ca şi celulele bătrîne, la care sinteza ARN a încetat, iar cel existent a fost folosit ca sursă de N şi P.

„Nucleul"

(Pl. 57, 58)

Spre deosebire de celulele eucariote care au un nucleu cu structură bine definită, mărginit de o membrană și conținînd un număr definit de cromosomi capabili de diviziune mitotică, „nucleul" bacterian reprezintă o formă primitivă de organizare, lipsită de membrană (de tip procariot), inclavată direct în citoplasmă, în mod obișnuit în partea centrală a celulei, și care nu suferă modificări de tip mitotic în cursul ciclului de diviziune.

Datorită caracterelor sale particulare, această structură a fost desemnată cu numeroși termeni ca : *nucleoid*, *nucleosom*, *material nuclear*, *nucleoplasmă*, *echivalent nuclear* sau *nucleu* prin analogie funcțională cu structura echivalentă a celulelor eucariote.

Studiul nucleoidului la microscopul fotonic s-a lovit de dificultăți legate nu atît de micimea celulei bacteriene, cît mai ales de bazofilia intensă a citoplasmei, foarte bogată în ARN, care nu a permis diferențierea cu coloranți bazici a materialului nuclear constituit din ADN, la fel de bazofil. Datorită acestui fapt, evidențierea corpului cromatinic bacterian la microscopul fotonic nu se poate face prin colorare selectivă decît după îndepărtarea ARN citoplasmatic realizată prin hidroliză acidă (tehnica Robinow și Feulgen) sau enzimatică (tehnica Boivin, cu ribonuclează). Cu aceste tehnici, materialul nuclear apare sub diferite forme (granule sferice sau ovalare, halteră, bastonașe izolate sau dispuse în V, filament axial etc.), reprezentînd 5–16 % din volumul celulei.

Pe micrografiile electronice, materialul nuclear este localizat în mod obișnuit în partea centrală a celulei. El se prezintă ca o zonă mai clară, cu o densitate medie mai mică decît aceea a citoplasmei înconjurătoare, astfel că la bacterii contrastul dintre structurile intracelulare este inversat în raport cu acela caracteristic celorlalte celule, la care nucleul este mai dens decît citoplasma. Acest aspect specific este determinat nu de vreo particularitate a lui, ci de densitatea neobișnuit de mare a citoplasmei bacteriene. Pe secțiuni ultrafine s-a observat că regiunea nucleară este plină cu fibrile fine cu ∅ între 2,0 și 5,0 nm, uneori aranjate în șiruri ondulate, paralele, care seamănă cu o jurubiță de ață, cîteodată răsucită, care dispar după digestia cu dezoxiribonuclează, ceea ce arată că ele sînt formate din ADN și corespund cromosomului bacterian.

Extras cu metode speciale, *cromosomul bacterian* — denumit și *lineom*, *nucleosom* sau *genofor* — s-a dovedit a fi alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN, de formă circulară (extremitățile ei nefiind libere, ci reunite), cu o lungime de 1 400 μm și un ∅ de 2,5 nm, corespunzînd diametrului moleculei de ADN dublu catenar.

Organizarea fizică a nucleului. În prezent nu se cunoaște modul în care această moleculă imensă — depășind de aproximativ 1 000 de ori lungimea lineară a celulei — este „împachetată" pentru a forma un corp cromatinic de 1 500 de ori mai mic decît propria sa dimensiune în stare desfășurată. Teoretic, „împachetarea" unei molecule atît de lungi într-un

volum mic implică plierea moleculei de cel puţin 1 000 de ori şi menţinerea ei în stare compactă.

Au fost propuse mai multe modele pentru a explica mecanismul acestui proces — care dacă s-ar face la întîmplare ar duce inevitabil la „încurcarea" moleculei de ADN şi la faptul că o parte din informaţia genetică ar deveni inaccesibilă la nevoie pentru transcriere.

Stonington şi Pettijohn (1971) au izolat nucleul din *E. coli* sub forma unei structuri compacte cu g.m. $2{,}5 . 10^9 \pm 0{,}5 . 10^9$ dal (1 600—1 700S). Această structură este alcătuită din ADN corespunzînd genomului pliat, complexat cu ARN şi proteine şi este foarte sensibilă la RNază. Complexul ADN — ARN — proteină conţine 80 % ADN; ARN reprezintă 10 % din greutate şi este format din ARNr şi ARNm, în stare născîndă, iar proteina, care formează tot 10 % (mai puţin de 1% din proteina celulară totală), este ARN-polimerază (subunităţile α, β şi β′). După tratare cu ribonuclează, din complexul astfel format se eliberează o moleculă de ADN dublu helicală depliată, ceea ce demonstrează că ARN are rolul de a stabiliza şi menţine forma condensată (compactă) a nucleului.

Ulterior, Pettijohn şi Hecht (1974) au elaborat un model în acord cu care ADN din cromosomul de *E. coli* ar fi condensat într-o structură compactă printr-un proces de pliere şi formare de superhelice, în care structura condensată a ADN este menţinută de molecule de ARN, ce leagă şi stabilizează buclele de pliere. Pentru a menţine starea condensată a ADN este necesară o sinteză continuă de ARN, fapt care explică asocierea ARN-polimerazei. Modelul poate fi uşor înţeles dacă admitem că cromosomul bacterian ar fi pliat într-un număr limitat de bucle (12—80, în medie 50/cromosom, Worcel şi Burgi, 1974), fiecare avînd aceeaşi concentraţie de superhelice. Interacţiunea care stabilizează fiecare buclă, împiedicînd deplierea ei, are rolul de a împiedica şi propagarea rotaţiilor de la o buclă la alta. Datorită aceleiaşi interacţiuni, secţiunile produse de DNază pe o catenă de ADN determină derularea şi deplierea superhelicei moleculei ADN într-o singură buclă, fără a afecta concentraţia superhelicală în restul cromosomului (fig. 138).

Fig. 139 ilustrează cele două modificări conformaţionale care duc la condensarea ADN. Cromosomul circular nepliat, cu ∅ 350 μm (A), este pliat formînd, pentru uşurinţa reprezentării grafice, numai 7 bucle, care delimitează domeniile la nivelul cărora se va produce formarea de suprahelice prin răsucire. În realitate se pot forma 40—100 de bucle. Presupunînd că s-au format 40 de domenii egale, diametrul moleculei devine de aproximativ 30 μm. Precizarea poziţiilor de pliere şi de separare a moleculei de ADN în domenii de formare a suprahelicelor este asigurată de una sau de mai multe molecule de ARN pe cale născîndă, legate la una dintre extremităţi prin ARN-polimeraza asociată, iar la cealaltă direct, fapt care limitează rotarea dublei helice la nivelul lor. Cromosomul pliat suferă formarea de superhelice răsucită spre stînga după modelul lui Worcel şi Burgi (1972) (C). În acest caz, diametrul particulei depinde de „pasul" dublei helice. Presupunînd un pas de 11,0 nm, diametrul moleculei de ADN este de aproximativ 2 μm. Modelul este prezentat bidimensional; structura tridimensională se poate obţine fără a modifica diametrul, dacă ne imaginăm îndoirea domeniilor

superhelicale înainte şi înapoi în raport cu planul hîrtiei. În acord cu acest model este probabil că toate genele au cel puţin un capăt la suprafaţa regiunii nucleare şi sînt în felul acesta oricînd accesibile procesului de transcriere genetică.

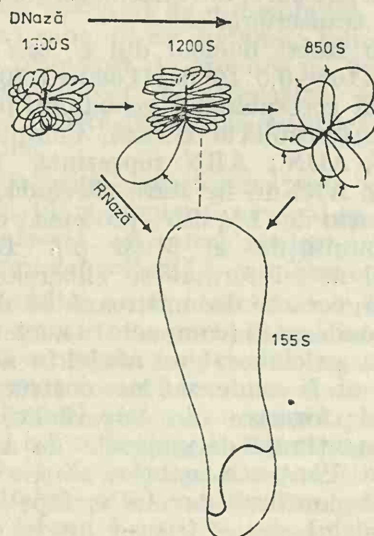


Fig. 138. — Modelul lui Worcel şi Burgi (1972) pentru plierea cromosomului la *E. coli*. Cromosomul formează ~ 50 bucle superhelicale în jurul unei structuri centrale formată din ARN. Tratarea cu DNază, care produce incizii monocatenare, eliberează bucle individuale şi reduce progresiv valoarea constantei de sedimentare (S) de la 1 500 S la 155 S. Tratarea cu ribonuclează depliază complet cromosomul, dîndu-i o formă care sedimentează mai lent.

Rouvière-Yaniv (1975) a izolat de la *E. coli* o proteină specifică — proteina *HU* — asociată cu ADN şi implicată în plierea lui în celulă. Proteina *HU* este un multimer termostabil al unui polipeptid de ~ 9 Kdal,

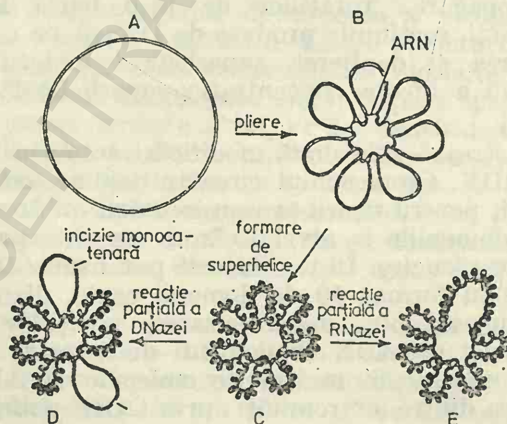


Fig. 139. — Modelul lui Pettijohn (1974) de „împachetare" a cromosomului bacterian. A. Cromosom circular nepliat cu Ø 350 µm. B. Cromosom pliat cu 7 bucle. În realitate, ar exista 40—80 domenii de pliere, corespunzînd unui Ø de 30 µm. C. Cromosom pliat în care buclele au suferit transformare superhelicală. Dacă pasul superhelicei este de 11 nm, Ø nucleului este de 2µm. Modelul bidimensional devine tridimensional prin plierea zonelor superhelicale deasupra şi dedesubtul planului hîrtiei. DNaza produce incizii monocatenare şi desface superhelicea în bucla respectivă, fără a afecta structura superhelicală a altor domenii (D). E. Secţionarea a două molecule de ARN ale unor domenii adiacente uneşte cele două domenii fără pierderea structurii lor superhelicale.

asemănătoare cu histonele prin bogăţia în lizină şi alanină. Nu conţine cisteină şi triptofan şi are un punct izoelectric ridicat. Se leagă de ADN (d.c. şi m.c.) şi de ARN (m.c.). Există aprox. 30 000 lanţuri de proteină *HU* (proteina 2) per cromosom de *E. coli*, ceea ce corespunde unui raport de o moleculă *HU* pentru fiecare 150—200 perechi de baze ADN. Proteina *HU* determină plierea ADN şi în cantităţi suficiente asigură aşezarea lui în anse în formă de ghirlande, foarte condensate. Proteine similare ca dimensiuni, compoziţie şi proprietăţi au fost izolate de la unele cianobacterii.

În mod normal, bacteriile aflate în faza de repaus în culturi staţionare şi vechi au un singur cromosom, astfel că sînt uninucleate. În faza de creştere activă, în culturi tinere pe medii optime, ele apar ca multinucleate, avînd 2—4 cromosomi, care sînt însă genetic identici, deoarece provin prin replicare dintr-un singur cromosom parental. De aceea, indiferent de aspectul morfologic al materialului nuclear, din punct de vedere genetic, bacteriile sînt în mod normal organisme esenţialmente *haploide*, astfel încît chiar atunci cînd celula primeşte un aport de material nuclear exogen — prin procese de transfer genetic — diploidia nu este decît parţială şi tranzitorie.

Apariţia bacteriilor multinucleate este în mod obişnuit rezultatul unei lipse de sincronizare între ritmul de creştere şi ritmul de diviziune celulară. Cînd celula este în stare de repaus, viteza de replicare a materialului nuclear este proporţională cu viteza de creştere a celulei. În culturi tinere, ca şi pe medii de cultură optime, replicarea ADN este accelerată astfel că nucleoidul se poate multiplica de mai multe ori, înainte ca diviziunea celulară să fi avut timpul să se desăvîrşească. Bacteriile multinucleate apar şi sub influenţa unor condiţii de mediu care interferă nu cu diviziunea nucleară, ci cu aceea a celulei. Astfel, sub acţiunea penicilinei care blochează sinteza componentei muraminice a peretelui celular, acesta nu mai poate participa la formarea septurilor transversale de diviziune încît apar celule filamentoase sau globuloase, cu mai mulţi nuclei.

Semnificaţie biologică. Cromosomul bacterian poartă în structura sa toată informaţia genetică esenţială, necesară pentru existenţa unei celule, respectiv setul de determinanţi genetici reprezentînd acel minimum necesar pentru ca o bacterie dată să poată ocupa poziţia sa ecologică normală (gene necesare pentru metabolismul energetic, pentru biosinteză, creştere şi diviziune şi, în acelaşi timp, pentru reglarea activităţilor celulare). El determină şi arhitectura celulei bacteriene, ereditatea şi capacitatea de evoluţie a acesteia.

Ribosomii

(Pl. 59, 60)

Ribosomii sînt particule nucleoproteinice intracitoplasmatice de formă aproximativ sferică, avînd un diametru de circa 20nm, care pot fi caracterizate după constanta lor de sedimentare la ultracentrifugă (apreciată

în unități Svedberg — S) și prin capacitatea de a participa *in vitro* la sinteza proteinelor.

La eucariote, ribosomii pot fi liberi în matricea citoplasmatică sau legați de membranele reticulului endoplasmic și au constanta 80 S (g.m. 4,5 × 10^6 dal), iar cei din mitocondrii și cloroplaste 70 S.

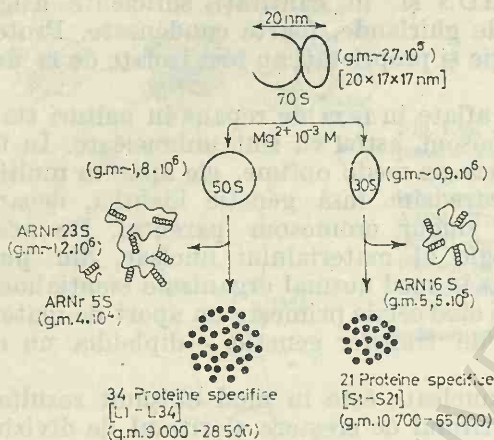


Fig. 140. — Structura moleculară a ribosomilor bacterieni.

La procariote, în faza de creștere activă, se găsesc în citoplasmă 15 00 — 100 000 (în medie 20 — 30 000) particule ribosomale, avînd în general constanta de sedimentare 70 S (g.m. 3 × 10^6 dal), dar prezentînd tendința de a se disocia rapid, în două subunități mai mici, inegale, avînd constantele de sedimentare 30 S și 50 S .

Mărimea și stabilitatea ribosomilor este în funcție de concentrația ionilor Mg^{2+} și K^+. La concentrația de Mg^{2+} prezentă în mod normal în celula bacteriană, 70—90 % din subunități sînt grupate două cîte două — cîte una din fiecare tip — în unități 70 S, printr-un proces care este reversibil, deoarece scăderea concentrației Mg^{2+} antrenează desfacerea ribosomilor 70 S, în unitățile lor constitutive, 30 S și 50 S. Prin urmare, ribosomii 70 S, caracteristici celulelor procariote se disociază reversibil în prezența unei concentrații reduse de Mg^{2+}, în cantități stoichiometrice de subunități 30 S și 50 S, pentru a se reasambla cînd concentrația Mg^{2+} crește după reacția : 70 S ⇄ 30 S + 50 S.

Ribosomii 70 S de la *E. coli* sînt formați din 55 de molecule de proteine și 3 molecule ARNr, grupate în două subunități inegale 30 S și 50 S, disociabile reversibil. Raportul dintre ARN și proteine variază de la 2 :1 în *E. coli*, la 2 :3 în alte organisme. ARN ribosomal interacționează cu proteinele ribosomale în așa fel încît menține structura tridimensională a ribosomului (fig. 140). Ca și ARNm, ARNr este sintetizat printr-un proces de transcriere după modelul ADN, fapt demonstrat prin capacitatea ARNr de a forma molecule hibride specifice ADN — ARNr cu anumite porțiuni din ADN celular*).

*) Cînd ADN natural este încălzit, legăturile de H se rup și cele două catene complementare se separă. Dacă temperatura este scăzută lent, cele două catene se reunesc spontan prin mecanismul de împerechere a bazelor complementare pentru a reface ADN originar. Anumite porțiuni din catenele ADN se vor combina specific cu ARNr provenit de la aceeași specie (nu însă și de la specii diferite) spre a forma molecule helicale hibride ARN—ADN.

Subunitatea mică 30 S (g.m. 900 000 dal) este alcătuită din 21 molecule de proteine diferite (g.m. între 10 700 dal şi 65 000 dal) notate de la S_1 la S_{21} (*S* de la engl. *small* = mic) şi o moleculă de ARNr (g.m. 560 000 dal), notată 16 S, formată din aproximativ 16 000 nucleotide. După Lake (1981), subunitatea ribosomală mică are trei regiuni, corespunzînd *capului* (care reprezintă 1/3 din subunitatea mică), *bazei* (care formează restul de 2/3) şi *platformei*, care este separată de cap printr-o scobitură numită *fisură* sau *despicătură* („cleft").

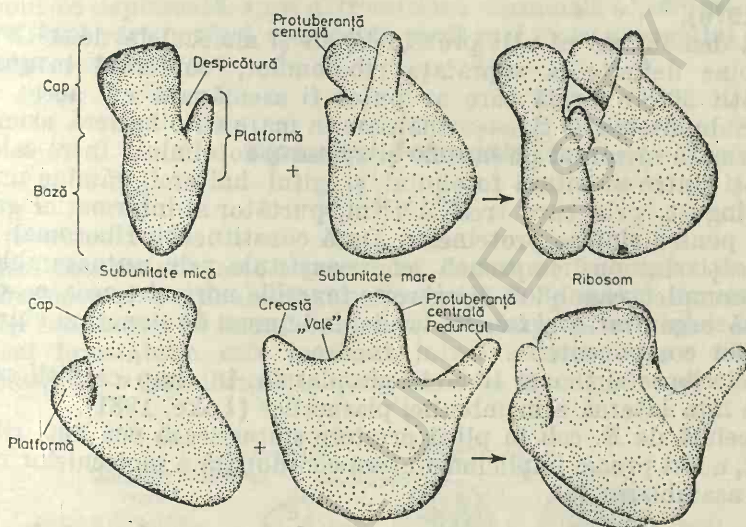


Fig. 141. — Reprezentarea schematică a subunităţilor ribosomale 30 S şi 70S.

Subunitatea mare 50 S (g. m. 1 600 000 dal) este alcătuită din 34 de proteine diferite (g.m. între 9 000 şi 28 500 dal), notate convenţional de la L_1 la L_{34} (*L* de la engl. *large* = mare), şi două molecule de ARNr, una foarte mare, 23 S, cu g.m. 1 100 000 dal, şi a doua foarte mică, 5 S, cu g.m. 36 000 dal.

Moleculele 16 S şi 23 S ale ARNr nu sînt transcrise separat, ci derivă din degradarea catalizată de o nuclează a unui precursor mare 30 S (pre-ARNr). Modelul de structură al subunităţii mari include o *protuberanţă centrală*, flancată de cîte o prelungire de fiecare parte, cea mai extinsă fiind numită *pedunculul*, iar cealaltă *creastă* („ridge"), între ele avînd o „vale" (fig. 141). Cînd cele două subunităţi sînt asociate, pedunculul subunităţii mari are baza aproape de constricţia de pe o subunitate mică, iar capul unei subunităţi mici şi protuberanţa subunităţii mari sînt aproximativ aliniate (Lake, 1981).

Interacţiunile exacte dintre proteinele ribosomale şi ARNr controlează atît procesul de asamblare al ribosomilor, cît şi funcţia lor. Datorită acestui fenomen, fiecare ARNr 30 S şi 50 S leagă numai anumite proteine ribosomale specifice. Nu se ştie pînă în prezent care sînt secvenţele nucleotidice implicate în legarea proteinelor şi nici care sînt secvenţele

de aminoacizi complementare pe proteina legată (Traub şi Nomura, 1978).

Examenul electronooptic al ribosomilor permite evidenţierea formei lor globale şi a organizării tridimensionale a constituenţilor ribosomali, fără detalii privind structura lor internă. Utilizarea unor tehnici fine, ca microscopia electronică a ribosomilor trataţi cu anticorpi specifici marcaţi pentru fiecare proteină în parte sau studiul dispersiei unui fascicul de neutroni, cu care sînt iradiaţi ribosomii, a permis determinarea aranjamentului în spaţiu al moleculelor componente (Stöffler, Engelman şi Moore, 1976).

S-a demonstrat că atît proteinele, cît şi moleculele de ARN ocupă poziţii bine definite la suprafaţa ribosomilor, conferind în ansamblu subunităţii 50 S o formă care ar putea fi asemănată cu aceea a unui fotoliu. Subunitatea 30 S, asemănătoare în mare cu o halteră asimetrică, ar fi rezemată orizontal pe braţele şi spătarul fotoliului. Între cele două subunităţi (între scobitura fotoliului şi gîtul halterei) rămîne un canal lung şi îngust, prin care trece ARNm, purtător al informaţiei genetice necesare pentru sinteza proteinelor. Dacă constituenţii ribosomali izolaţi şi purificaţi sînt puşi împreună, ei reconstituie prin autoasamblare un ribosom complet, capabil să-şi exercite funcţiile normale, ceea ce demonstrează că organizarea şi funcţia lor depind numai de structura chimică a moleculelor componente.

Unii ribosomi înoată liber în citoplasmă, în timp ce alţii apar ca legaţi de faţa internă a membranei plasmatice (Lake, 1981).

O celulă de *E. coli* în plină creştere sintetizează cca 500 ribosomi pe minut, acest proces implicînd sinteza coordonată a moleculelor componente şi asamblarea lor.

Semnificaţie biologică. Ribosomii sînt componenţi esenţiali ai sistemului de traducere a informaţiei genetice, reprezentînd adevărate „fabrici" de proteine. La nivelul lor se desfăşoară un ansamblu de reacţii, formînd

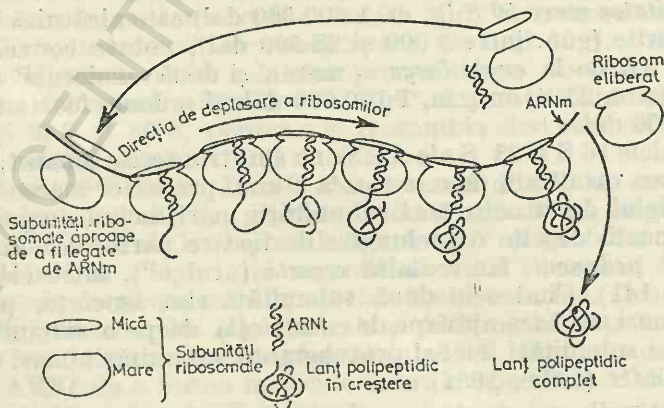


Fig. 142. — Rolul poliribosomilor în biosinteza proteinelor.

ciclul ribosomal, care determină iniţierea, creşterea şi terminarea lanţului polipeptidic, în care interacţionează cu ARNm, pentru a lega specific moleculele de aminoacizi, asigurînd formarea moleculei de proteine.

Această activitate are loc numai cînd cele două subunităţi sînt asociate şi combinate cu ARNm, ca şi cu alţi componenţi neribosomali ca ARNt şi unele proteine.

În cursul procesului de biosinteză a proteinelor, ribosomii individuali au tendinţa de a se grupa în şiruri lineare de 4—50 de elemente, pentru a forma *polisomi* (poliribosomi sau ergosomi). Mărimea acestora este determinată, în primul rînd, de lungimea moleculelor de ARNm (fig. 142). Poliribosomii se deplasează de-a lungul moleculei de ARNm, permiţînd ca lanţul polipeptidic să crească progresiv în lungime, pe măsură ce ribosomii se deplasează spre extremitatea terminală a secvenţei de baze traduse, fapt care conferă o eficienţă mult mai mare procesului de biosinteză a proteinelor.

Aparatul fotosintetic

(Pl. 61—64)

Aparatul fotosintetic este reprezentat de întregul complex de structuri membranoase şi particulate, care participă în procesul de conversie al energiei luminoase în energie chimică. În timp ce la celulele eucariote aparatul fotosintetic este localizat într-o structură uşor observabilă, delimitată de o membrană — *cloroplastul* — la celulele procariote este

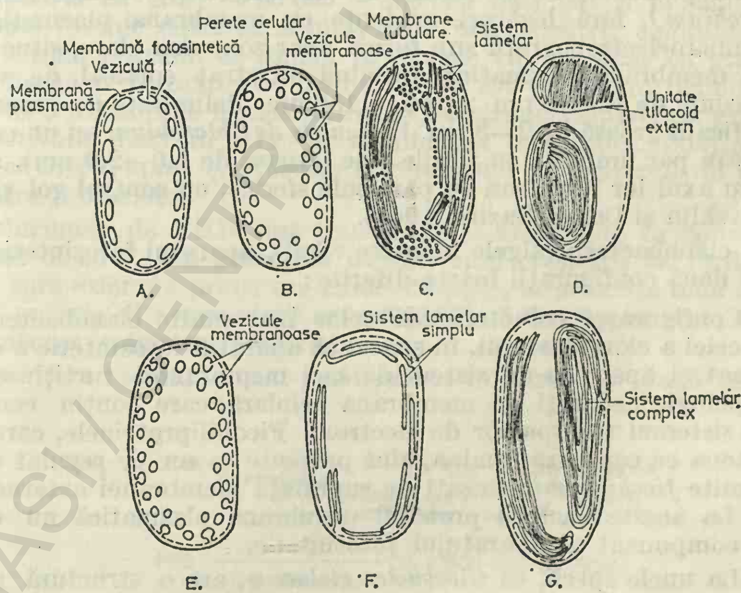


Fig. 143. — Reprezentarea schematică a aparatului fotosintetic la bacterii. A. *Chlorobacteriaceae*. B. *Thiorhodaceae* I cu vezicule membranoase. C. *Thiorhodaceae* II cu membrane tubulare. D. *Thiorhodaceae* III cu sistem lamelar. E. *Athiorhodaceae* I cu vezicule membranoase. F. *Athiorhodaceae* II cu sisteme lamelare simple. G. *Athiorhoda ceae* II cu sisteme lamelare complicate.

mai puțin evident și este localizat în complexul topologic al membranei plasmatice care prezintă invaginări extinse sub formă de vezicule și sisteme lamelare în regiunea citoplasmatică (fig. 143). Datorită acestui fapt, membrana plasmatică la bacterii este inclusă ca entitate structurală a aparatului fotosintetic. Este probabil că și sistemele lamelare ale cianobacteriilor sînt derivate tot din membrana plasmatică.

A. La bacteriile sulfuroase roșii (*Thiorhodaceae*), aparatul fotosintetic prezintă o mare variație morfologică, datorită celor trei tipuri de structuri derivate din membrana plasmatică: 1) *vezicule membranoase simple* situate la extremitățile membranelor celulare invaginate (*Chromatium*); 2) *membrane tubulare*, înguste, paralele sau ca o rețea tridimensională de tuburi ramificate neregulat (*Thiococcus*) sau 3) *pachete* sau *fascicule de lamele* (8–12 perechi), ancorate de membrana plasmatică, formînd o unitate integrală în celulă. Mărimea și numărul lamelelor sînt proporționale cu intensitatea luminii.

B. La bacteriile nesulfuroase roșii (*Athiorhodaceae*), aparatul fotosintetic se poate prezenta ca: 1) *vezicule membranoase* dispersate în toată citoplasma, foarte frecvent rămase în continuitate cu membrana plasmatică (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*); 2) *sisteme lamelare simple*, dispuse în pachete la periferia celulei (*Rhodops. fulvum*) sau 3) *sisteme lamelare complicate*, dispuse în inele concentrice în jurul periferiei celulare (*Rhodops. viridis*).

C. La bacteriile verzi din genul *Chlorobium*, aparatul fotosintetizant este reprezentat de un sistem de vezicule mari, ovalare (*veziculele de Chlorobium*), fără legături evidente cu membrana plasmatică. Ele apar pe microelectronografii sub forma unor zone mai clare, situate imediat sub membrana plasmatică, formînd un strat cortical de vezicule cu dimensiuni de 30–40 nm × 100 – 150 nm, delimitate de o membrană unistratificată groasă de 2–3 nm. *Veziculele de Chlorobium* au un conținut omogen sau par umplute cu fibrile fine (groase de 1,0–2,0 nm), așezate paralel cu axul lor lung, sau cu particule sferice, cu centrul gol și ∅ de 10 nm (Echlin și Cohen-Bazire, 1963).

La cianobacterii (algele albastre-verzi), aparatul fotosintetic poate prezenta două configurații foarte diferite:

a) Configurația caracteristică celor mai multe cianobacterii este similară celei a cloroplastului, în sensul că aparatul fotosintetic a devenit internalizat și apare ca un sistem de saci membranoși turtiți sau *tilacoizi*, topologic separați de membrana celulară, care conțin centrii de reacție și sistemul transportor de electroni. Ficobiliproteinele, care reprezintă antena ce captează lumina, sînt prezente ca un șir regulat de granule, numite *ficobilisomi*, atașați de suprafața membranei externe a tilacoizilor. La aceste bacterii probabil membrana plasmatică nu conține nici un component al aparatului fotosintetic.

b) La unele specii, ca *Gloebacter violaceus*, are o structură analogă celei descrise la bacteriile verzi: sediul centrilor de reacție și al sistemului transportor de electroni este reprezentat de o membrană celulară cu topologie simplă, iar ficobiliproteinele sînt localizate într-un strat continuu subcortical.

Incluziunile

(Pl. 65)

Incluziunile sînt formaţiuni structurale inerte care apar în citoplasma bacteriilor la sfîrşitul perioadei lor de creştere activă. Prezenţa şi abundenţa lor variază în funcţie de condiţiile de mediu.

În funcţie de compoziţia chimică pot fi clasificate în: 1) *polimeri organici* (incluziunile de glicogen, amidon şi poli-β-hidroxibutirat); 2) *polimeri anorganici* (incluziunile de polimetafosfat) şi 3) *incluziunile anorganice simple* (granulele de carbonat de calciu şi de sulf coloidal).

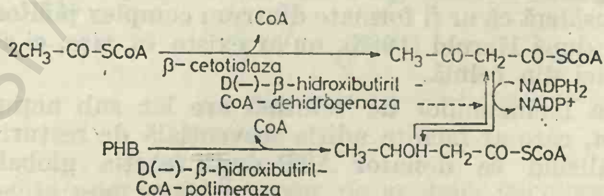
După structura lor, evidenţiată pe electronografii sînt de două tipuri: 1) *incluziuni înconjurate de membrane* (cele de poli-β-hidroxibutirat, de sulf şi carboxisomii) şi 2) *incluziuni neînconjurate de membrane* granulele de glicogen, de volutină, de cianoficină, ficobilisomii, incluziunile cristaline şi paracristaline şi rhapidosomii) (Shively, 1974).

Incluziunile de glicogen şi amidon (polimeri de glucoză) sînt prezente în special la bacterii sporulate aerobe. Ele apar ca mase mici de 50—100 nm ∅, puternic refringente, vîscoase, care se colorează cu iod în galben-brun (glicogenul) sau în albastru (amidonul), în contrast cu citoplasma gălbuie.

Incluziunile de poli-β-hidroxibutirat — PHB (poliester al acidului β-hidroxibutiric cu g.m. ∼ 60 000 — 250 000 dal) pot fi evidenţiate la microscopul fotonic datorită afinităţii lor mari pentru coloranţii liposolubili de tipul negrului de Sudan. În celulele vii, ele apar ca granulaţii rotunde foarte refringente, cu diametrul de 100—800 nm, delimitate la periferie de o membrană monostratificată, electrontransparentă, groasă de 2 nm, derivată dintr-un strat al membranei plasmatice. Conţin 98 % PHB şi circa 2 % lipide şi proteine şi reprezintă un material de rezervă tipic pentru procariote.

Incluziunile de PHB sînt sintetizate şi acumulate în concentraţii mari (pînă la 60 % din greutatea uscată) cînd creşterea bacteriilor este limitată, spre exemplu printr-un deficit de azot, în prezenţa unor surse de carbon şi energie. Ele reprezintă rezervă celulară de C şi energie, caracteristică tuturor celulelor procariote.

Biosinteza acidului poli-β-hidroxibutiric are loc după reacţiile:



Utilizarea lui începe cînd sursa exogenă de energie nu mai este accesibilă celulelor şi este iniţiată de o depolimerază care eliberează D(—)-β-hidroxibutiratul din granule pentru a fi oxidat la acetoacetat de o D(—)-β-hidroxibutirat-dehidrogenază NAD-specifică. Acetoacetatul este

apoi introdus în căile metabolismului intermediar de o reacţie a CoA-transferazei.

Carboxisomii sau corpii poliedrici sînt incluziuni cu profil poliedric (poligonal) prezente în număr variabil (1—200) la bacteriile care fixează CO_2 pe calea pentozofosfaţilor. Au diametrul de 90—500 nm, sînt delimitate de o membrană monostratificată, groasă de 3,0—4,0 nm, şi sînt localizate în regiunea nucleoplasmică.

Prezintă o structură granulară, datorită unor particule cu ∅ 10 nm, formate din molecule de ribulozo-1,5,difosfat-carboxilază, dispuse în şiruri paracristaline.

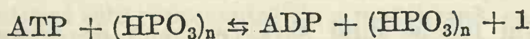
Carboxisomii sînt depozite de enzime cu activitate în fixarea CO_2 (Shively, 1973).

Granulele de cianoficină (granulele structurate) — caracteristice cianobacteriilor —cu formă neregulat-sferoidală şi ∅ de 0,5—1,0 μm, prezente în celulele vegetative şi akineţi, sînt copolimeri de acid aspartic şi arginină(1: 1 mol/mol) cu g.m. 25 000—100 000 dal. Reprezintă rezerve celulare de azot, acumulate după încetarea creşterii. După Shively (1973), în cursul creşterii normale, aminoacizii sînt încorporaţi în structura proteinelor, în timp ce după încetarea creşterii, sînt depozitaţi în polipeptide de rezervă (Lang, 1972; Wolk, 1973).

Incluziunile parasporale se prezintă sub formă de octaedre bipiramidale, compuse din subunităţi bacilare cu dimensiuni de 4,7 nm × 11 nm şi g.m. 230 000 dal. Unele dintre ele ajung în final exterioare faţă de sporangiu *(Bacillus thuringiensis* var. *finitimus)*, în timp ce altele sînt închise în acesta. Formarea lor este corelată cu sporularea şi s-ar datora supraproducţiei de proteine ale învelişului sporal şi depozitării lor intracelular. Conţin o toxină care distruge bariera intestinală a larvelor de lepidoptere şi determină moartea lor cu fenomene de paralizie.

Incluziunile de polifosfat anorganic (polimetafosfat) formează prin depozitarea lor în citoplasmă structurile cunoscute sub denumirea de *granule de volutină* (descrise iniţial la *Spirillum volutans)* sau *corpusculii Babeş-Ernst*. Datorită conţinutului mare în polifosfat anorganic produc efecte metacromatice, se colorează în roşu-violet cu albastru de metilen sau albastru de toluidină *(granulaţii metacromatice)*. Apar sub forma unor granule sferice cu ∅ 48 nm — 1 μm, electronopace, fără structură internă, situate în regiunea nucleoplasmică. Sînt alcătuite din polimeri lineari de fosfat, cu lungimi variabile (pînă la 500 resturi pe moleculă polimer). Unii autori consideră că ar fi formate dintr-un complex polifosfat —ARN—proteine, care, după Harold (1965), nu ar exista *in vivo*, ci s-ar forma în cursul extracţiei din celulă.

Formarea incluziunilor de volutină are loc sub acţiunea enzimei *polifosfatkinaza*, care ar facilita adiţia secvenţială de resturi de fosfat la pirofosfat, utilizînd ca donator ATP după reacţia globală:



$$ATP + (HPO_3)_n \leftrightarrows ADP + (HPO_3)_n + 1$$

Semnificaţie biologică. Granulele de volutină acţionează ca un mecanism de reglare al economiei fosforului în celulă şi ar reprezenta o rezervă de P şi energie intracelulară, avînd funcţii termodinamic echivalente fos-

fatului bogat în energie al ATP. Ele se formează şi se acumulează în celulă, în diferite condiţii în care sinteza acizilor nucleici este împiedicată, ca, de exemplu, în lipsa sulfatului din mediu. Dacă celulele care au acumulat volutină sînt aprovizionate cu sulfat, polifosfatul dispare rapid printr-o reacţie inversă celei de sinteză, furnizînd celulei ATP, iar P este încorporat în acizi nucleici. Formarea lor reprezintă şi o modalitate de a preîntîmpina perturbările echilibrului osmotic.

Granulele de sulf apar sub forma unor corpusculi strălucitori birefringenţi, cu ∅ variabil (0,1 — 1,0 μm), acoperite de o membrană monostrat, alcătuită din subunităţi globulare proteice cu g.m. 13 500 dal şi ∅ 2,5 nm.

La *Beggiatoa* şi *Chromatium* sînt localizate intracitoplasmatic, iar la *Thiorhodaceae* în pungi invaginate ale membranei plasmatice, fiind deci în interior faţă de peretele celular şi exterior faţă de membrana plasmatică.

Granulele de sulf se găsesc în cantităţi mari la bacteriile care cresc în medii bogate în H_2S şi reprezintă un depozit de rezervă, deoarece dispar prin oxidarea sulfului, dacă sînt transferate într-un mediu sărac în H_2S.

Semnificaţie biologică. Incluziunile sînt structuri legate de activitatea metabolică a celulei bacteriene, reprezentînd, în cele mai multe cazuri, materiale de rezervă care se acumulează în diferite regiuni ale celulei atunci cînd dezvoltarea culturii se face în ritm lent sau a încetat. Dovada o constituie faptul că ele sînt mai abundente la bacteriile cultivate în medii bogate în substanţe nutritive sau cu un dezechilibru în raportul C/N şi că dispar după trecerea celulelor în medii sărace sau cu un raport C/N normal (fig. 144).

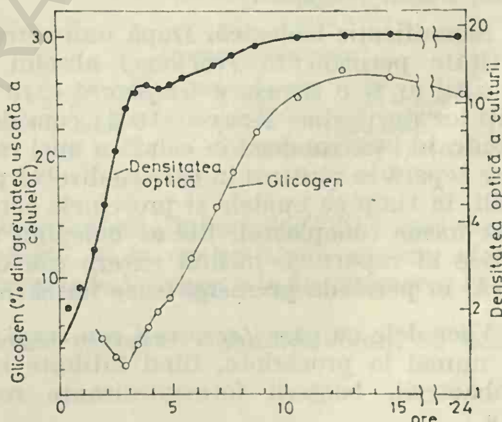


Fig. 144. — Acumularea de glicogen într-o cultură de *Aerobacter aerogenes* în mediu bogat în glucoză şi sărac în azot. Sinteza glicogenului începe după oprirea creşterii, determinată de epuizarea sursei de azot (NH_4^+) (după Segel şi colab. 1965).

În absenţa unor surse exogene de energie, microorganismele utilizează rezervele de energie intracelulare (polizaharide, PHB), iar cînd le epuizează şi pe acestea utilizează proteinele celulare şi ARN. Rezervele intracelulare de energie sînt în primul rînd degradate, de enzimele depolimerizante de la monomeri (zaharuri, acizi graşi, β-hidroxibutirat), care

intră într-una din căile producătoare de energie descrise pentru substraturile exogene.

Capacitatea celulei bacteriene de a depune substanţele de rezervă sub formă de polimeri reprezintă şi o reacţie de apărare a echilibrului osmotic celular. Prin acest proces de polimerizare, compuşii liberi sînt făcuţi osmotic inerţi, în timp ce acumularea lor ca atare, sub formă de monomeri (glucoză, acid hidroxibutiric etc.), ar mări presiunea osmotică intracelulară dincolo de limita de rezistenţă a peretelui celular, ceea ce ar produce liza celulei. În plus, în cazul incluziunilor de acid poli-β-hidroxibutiric, polimerizarea împiedică acidifierea citoplasmei, blocînd prin esterificare grupările carboxil ale monomerului de acid-β-hidroxibutiric. Capacitatea bacteriilor de a acumula materiale de rezervă este diferită. Unele (de ex., *Pseudomonas aeruginosa)* nu formează nici un material de rezervă, în timp ce altele formează unul sau mai multe substanţe tipice de depozit.

Vacuolele

(Pl. 66—68)

Vacuolele sînt formaţiuni sferice cu ∅ de 0,3—0,5 μm, mai puţin refringente decît citoplasma, care apar în celula bacteriană în perioada ei de creştere activă.

Numărul lor este variabil în raport cu mediul de cultură (6 — 20/celulă). Ele conţin diferite substanţe dizolvate în apă şi sînt înconjurate la periferie de un înveliş lipoproteic unistratificat, gros de aproximativ 3,0 nm, numit *tonoplast*.

Semnificaţie biologică. După unii cercetători, vacuolele ar constitui o entitate permanentă *(vacuom)* absolut necesară celulei bacteriene, după alţii ar fi o *structură temporară* care apare *de novo*, sub influenţa condiţiilor de mediu. Knaysi (1951) consideră că vacuolele se formează ca rezultat al pătrunderii în celulă a unei cantităţi de apă în exces, care apoi se separă în picături în care se dizolvă produşii de metabolism hidrosolubili, în timp ce lipidele şi proteinele acumulate în jurul acestor picături ar forma tonoplastul. Ele ar îndeplini rolul de reglatori ai presiunii osmotice în raport cu mediul extern sau de depozite de substanţe de rezervă, în perioada premergătoare formării incluziunilor.

Vacuolele cu gaze *(aerosomi sau corpi de flotaţie)* sînt structuri prezente numai la procariote, fiind întîlnite la bacteriile imobile acvatice (cianobacterii, bacterii fotosintetizante roşii şi verzi, *Halobacterium* sp. ş.a.).

La microscopul în contrast de fază apar ca nişte granule strălucitoare, refringente, pe fondul negru al celulei, putînd fi identificate graţie faptului că, spre deosebire de alte structuri, *dispar la presiune moderată*, prin eliminarea gazului pe care-l conţin. La microscopul electronic apar ca un organit compus dintr-o serie de *vezicule cu gaz*, al căror număr, aranjare şi localizare intracelulară determină mărimea şi forma vacuolei.

Veziculele cu gaze sînt unități independente de structură și funcție, avînd forma unui cilindru cu capetele conice, lung de 200 — 1 000 nm și gros de 75 nm, fiind delimitate la periferie de o membrană monostrat, rigidă, electrondensă, cu aspect striat, datorită subunităților componente (cu grosime de 2—3 nm). La cianobacterii și la bacteriile verzi, veziculele sînt mai alungite și aranjate în faciscule paralele, în timp ce la bacteriile fototrofe roșii, ca și la *Halobacterium* sînt mai scurte și mai neregulat distribuite în celule. Membrana veziculelor este impermeabilă la apă, dar permite trecerea prin difuziune a gazelor. De aceea, natura gazelor este determinată de atmosfera înconjurătoare.

Semnificație biologică. Bacteriile care conțin vacuole „umflate" cu gaze au o densitate globală mai mică decît apa și de aceea plutesc la suprafața acesteia. Gradul de umflare fiind reglabil, ele reprezintă un dispozitiv celular care permite bacteriilor acvatice imobile să-și modifice poziția într-o coloană verticală de apă, mecanism care funcționează cu eficiență mai ales în lacurile stagnante.

În natură, veziculele se turtesc și pierd gazele prin difuziune, cînd suma presiunilor care acționează pe suprafețele lor externe depășește cu o anumită valoare presiunea internă (fig. 145).

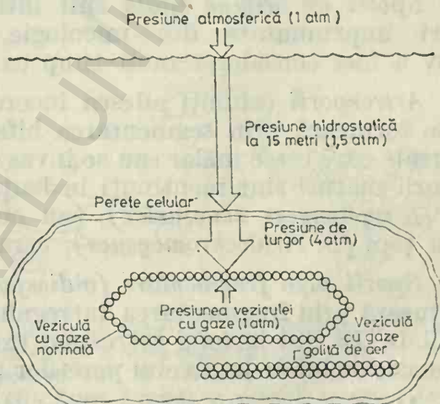


Fig. 145. — Sursele de presiune care acționează asupra veziculelor cu gaz într-o bacterie.

La celulele care plutesc la suprafața „înfloririlor" din lacuri vacuolele joacă și un rol protector, de ecran, și în același timp au un efect de dispersie a luminii, apărînd structurile fotosensibile de expunerea la intensități dăunătoare de lumină.

Vacuolele cu gaze reglează raportul suprafață/volum al celulelor bacteriene.

Sporul

(Pl. 69—76)

Sporul reprezintă o formă primitivă de diferențiere celulară, care constă în formarea, în celula vegetativă, a unui nou tip de celulă, avînd o ultrastructură, compoziție chimică și enzimatică diferite și o rezistență

deosebită la condiţiile nefavorabile de mediu. Toate bacteriile sporogene, cu excepţia genului *Desulfotomaculum* (Gram-variabil) sînt Gram-pozitive, fapt care ar putea reflecta intervenţia anumitor constrîngeri mecanice specifice, impuse de natura peretelui celular, în procesul de sporogeneză.

Sporogeneza este excepţională la coci *(Sporosarcina ureae)*, dar reprezintă un caracter de specie, cu valoare taxonomică importantă, la bacteriile cilindrice din familia *Bacillaceae*; sporul apare ca o structură constantă la bacteriile anaerobe aparţinînd genului *Clostridium* şi în mod facultativ la bacteriile aerobe din această familie grupate în genul *Bacillus*.

Diversitatea sporilor. Gama sporilor bacterieni este largă şi se întinde de la endosporii rezistenţi pînă la zoosporii fragili şi extrem de mobili, deosebindu-se după modul lor de formare, structură şi rezistenţă la factorii de mediu. Principalele tipuri de spori sînt următoarele (Cross, 1970):

1) *Sporul endogen (endosporul)* reprezintă forma cea mai caracteristică pentru bacterii; apare în interiorul unei celule vegetative, numită *sporangiu*, ca o formaţiune foarte refringentă, dotată cu mare rezistenţă la condiţii nefavorabile.

2) *Sporii de origine hifală* sînt întîlniţi la actinomicete şi poartă denumiri împrumutate din micologie, datorită faptului că grupul respectiv a fost considerat mult timp ca deosebit de bacterii (fig. 146).

a) *Artrosporii* (numiţi adesea incorect *conidii)*, similari celor de la fungi, se formează prin segmentarea hifelor de către o serie de septuri transversale care cresc inelar sau se invaginează, separînd hifele existente. Artrosporii maturi sînt menţinuţi în lanţuri de o teacă externă subţire, netedă *(Streptomyces venezuelae)*, sau cu o serie de apendice ca nişte peri sau ţepi *(S. viridochromogenes)*, caracteristice pentru fiecare specie.

b) *Sporii prin fragmentare (oidiospori)* au fost descrişi la *Nocardia* şi se formează prin fragmentarea întregului miceliu în elemente cocoide sau bacilare. Ei sînt în fond artrospori exogeni, formaţi prin dezarticularea elementelor hifale la nivelul pereţilor transversali preformaţi.

c) *Aleuriosporii* sînt spori solitari care iau naştere apical sau lateral pe sporofori scurţi, după care sînt eliberaţi pasiv fie prin liza hifei care îi menţine, fie prin ruperea ei la joncţiunea peretelui sporal (de ex., la *Micromonospora)*.

d) *Sporii menţinuţi în vezicule* se formează prin septarea hifelor existente în interiorul unui înveliş, care le înconjură ca o veziculă sporală, fără legătură cu sporangiul de la fungi. Pot fi mobili *(zoospori)* ca la *Actinoplanes*, *Planomonospora* etc. sau imobili *(aplanospori)* ca la *Streptosporangium* şi *Microellobospora*.

3) *Chiştii*, descrişi la *Azotobacter*, sînt stadii de repaus sau de supravieţuire, formate ca răspuns la modificările de mediu, şi provin din transformarea unei celule vegetative, în întregul ei, prin îngroşarea pereţilor şi acumularea de material de rezervă. Au o rezistenţă mai mică decît a endosporului.

4) *Gonidiile*, descrise la *Leptothrix ochracea*, apar endocelular prin contracția, condensarea și fragmentarea protoplasmei unei celule vegetative numită *gonidangiu*. În interiorul unei celule pot apărea mai multe gonidii, care se eliberează în mediu, după ruperea peretelui gonidangiului.

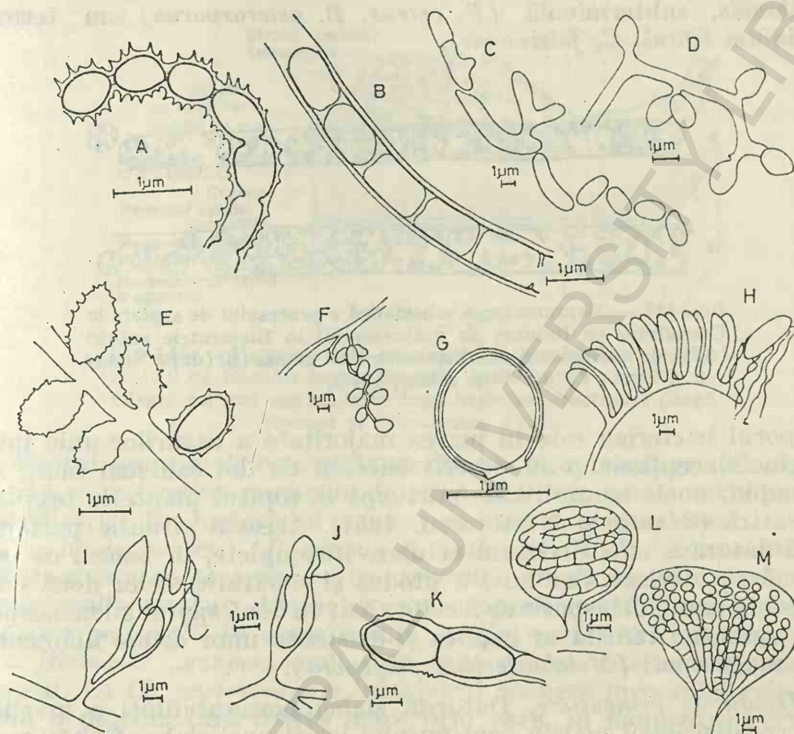


Fig. 146. — Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de spori prezenți la actinomicete. Artrospori de *Streptomyces viridochromogenes* (A) și *S. venezuelae* (B). Spori de fragmentare la *Nocardia* (C). Alcuriospori de *Micromonospora* sp. (D), *M. carbonaceae* (F) și *Thermomonospora curvata* (E). Secțiune într-un alcuriospor (G). Spori formați în vezicule sporale: Zoospori de *Planomonospora* (H), *Planobispora* (I) și *Dactylosporangium* (J). Aplanospori de *Microellobosporia* (K) și *Streptosporangium* (L). Zoospori de *Actinoplanes* (M).

Principala lor funcție privește capacitatea de reproducere. Gonidiile nu au rezistența caracteristică sporilor. Semnificația lor este încă discutată (fig. 147).

5) Au fost descrise și alte tipuri de forme de repaus ca *mixosporii*, *heterociștii* și *akineții*. Cele mai multe cunoștințe s-au acumulat — pentru rațiuni de ordin practic — referitoare la endospori.

Morfologie. Sporul tipic bacterian *(endosporul)* este o formațiune sferică sau ovalară, refringentă, cu dimensiuni variabile după specie și, în cadrul aceleiași specii, în funcție de vîrsta culturii și de condițiile de mediu. La unele specii, diametrul sporului poate depăși diametrul transvers al celulei, ceea ce determină deformarea acesteia. În medie, are dimensiuni

cuprinse între 0,5 și 0,9 μm × 1 și 1,5 μm și un volum mediu de 0,448 — 1,744 μ^3, ceea ce corespunde la aproximativ 1/7 — 1/17 din volumul și 1/3 din greutatea celulei-sporange.

Așezarea lui în celulă, variabilă la unele specii, constantă la altele, constituie un criteriu taxonomic: ea poate fi ecuatorială (centrală) ca la *B. anthracis*, subterminală *(B. cereus, B. asterosporus)* sau terminală *(Clostridium tetani, C. felsineum)*.

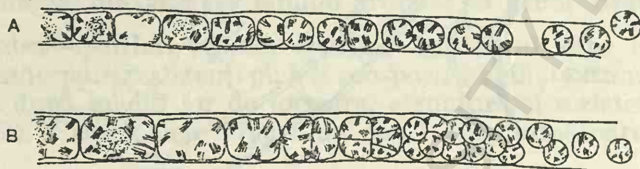


Fig. 147. — Reprezentarea schematică a procesului de septare la *Crenothrix*, cu formare de macrogonidii în filamentele subțiri (A) și de microgonidii în filamentele mai groase (B) (după Volker și colab., 1977).

Sporul bacterian este în marea majoritate a cazurilor unic într-un sporangiu. Excepțional s-au descris bacterii cu doi sau mai mulți spori (de exemplu, unele bacterii care participă la topitul plantelor textile din țara noastră (Zarnea și Nestorescu, 1957). Această situație particulară poate fi datorată unei diviziuni celulare incomplete, în sensul că celula sporogenă s-a divizat, dar nu s-a produs și separarea celor două celule-fiice. Deci, sporangiul bisporic ar fi echivalent cu două sporangii monosporice încă neseparate. Aceasta ar explica și existența unor celule filamentoase cu mai mulți spori *(Metabacterium polyspora)*.

Metoda de evidențiere. Datorită slabei permeabilități a învelișului lor extern, densității mari a conținutului lor și unei slabe afinități pentru coloranți, sporii nu se colorează cu metodele uzuale sau se colorează numai în contur. Ei rămîn incolori și refringenți în contrast cu restul formei vegetative care se colorează normal. Sporul poate fi însă colorat — apărînd ca un coc sferic sau ovalar omogen — cu ajutorul coloranților energici, după permeabilizarea la cald a pereților săi. În celulele vii examinate în preparate umede, între lamă și lamelă, sporul se observă ca o formațiune refringentă net distinctă în citoplasma granulară.

Ultrastructură. Sporii diferitelor specii de bacterii — aparent omogeni și similari la microscopul fotonic — se prezintă pe microelectronografii cu structură internă asemănătoare, dar cu grade diferite de organizare a învelișului lor extern.

Învelișul sporal are totdeauna o structură lamelară complexă, fiind alcătuit din trei straturi principale suprapuse — un strat extern de înveliș *(exina)*, unul mijlociu și unul intern *(intina)*; la unele specii, fiecare dintre aceste straturi este, la rîndul său, pluristratificat. Ele conțin aproximativ 40 % din proteina sporală și o cantitate de 4—5 ori mai mare de cisteină decît celula vegetativă (fig. 148). Sub învelișul sporal se observă o zonă transparentă mai puțin densă — *cortexul*, alcătuit din peptidoglican

modificat — dincolo de care se găsește *protoplastul sporal* (porțiunea centrală a sporului („core") sau celula sporală propriu-zisă) acoperită de un perete.

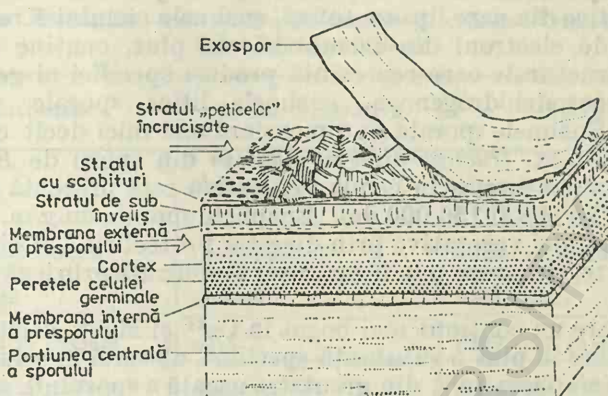


Fig 148. — Reprezentarea schematică a straturilor sporilor maturi de *Bacillus cereus*. Săgețile duble indică planurile de clivare cel mai des întîlnite după înghețare-fracturare (după Aronson și Fitz-James, 1976).

Sporul propriu-zis este alcătuit dintr-o citoplasmă granulară — *sporoplasma*, care conține particule de circa 10,0 nm, corespunzînd probabil ribosomilor, și din materialul nuclear alcătuind *nucleoplasma*.

La unele bacterii *(B. cereus, B. anthracis)*, în jurul învelișului sporal poate exista un *exosporium*, cu structură simplă sau complexă (format din mai multe straturi distincte) care acoperă sporul fie ca un sac lax, fie „strîns pe corp". În unele cazuri, spațiul perisporal este traversat de cîteva *filamente „suspensoare"* prin care sporul este ancorat de sacul exosporal. La *Cl. pasteurianum*, exosporul acoperă incomplet celula, prezentînd o deschizătură foarte mare prin care, în momentul germinării, iese celula vegetativă, lăsînd un exospor aparent intact.

Unii spori sînt prevăzuți la una din extremități cu un smoc de apendici, similari unor panglici, cu ∅ 130 nm, inițial spiralați, apoi rectilinii, orientați paralel, cu o lungime de 2—3 ori mai mare decît lungimea sporului, avînd originea în structurile învelișului sporal. Acești apendici au aspectul unui tub turtit sau uneori al unei pene de pasăre, fiind alcătuiți dintr-o structură axială centrală, ca un fel de tijă, de la care pornesc nenumărate filamente cu o lungime egală. Ei iau naștere treptat în cursul sporogenezei, ajungînd la un moment dat să umple tot spațiul din sporange rămas neocupat de spor. Apendicii sporali au o structură multistratificată ; una dintre suprafețele lor este netedă, iar cealaltă are numeroase neregularități care îi dau un aspect striat. Electronografiile pe secțiuni transversale demonstrează natura lor tubulară, fiecare tub fiind format din 3 straturi concentrice de subunități mici (∅ 2,5 nm), electrondense, și înconjurat de o „teacă" amorfă, alcătuită din substanțe mai puțin dense.

Semnificația lor biologică este nelămurită : ei ar fi organite care favorizează diseminarea sporilor în natură, ar ajuta nutriția sporului în cursul

formării sale sau ar fi lipsiţi de semnificaţie funcţională, rezultînd numai dintr-o alterare metabolică.

Compoziţie chimică. Protoplastul sporal prezintă numeroase activităţi enzimatice din care lipsesc totuşi enzimele ciclului Krebs şi ale unor transportori de electroni din membrană. În plus, conţine unele enzime şi proteine structurale care reprezintă produşi specifici ai genelor sporale (de ex., glucozodehidrogenaza, enzimele litice sporale, proteinele de înveliş etc.). Enzimele sporale au dimensiuni mai mici decît cele din celulele vegetative: ex. *fructozo-difosfat-aldolaza* din sporii de *B. subtilis* are g.m. 40 000 dal, în timp ce în celula vegetativă este prezentă într-un echilibru de g. m. 70 000 şi 150 000 dal. Enzimele sporale cu g.m. mică provin din cele ale celulei vegetative prin digestie proteolitică şi sînt mult mai termorezistente, deoarece pot fi mai uşor stabilizate prin legături intramoleculare.

Sporul are un conţinut mai bogat în Ca^{2+} şi Mg^{2+} decît celula vegetativă şi conţine în plus o substanţă specifică, absentă în celula vegetativă *acidul dipicolinic* (circa 10% din greutatea uscată a sporului), care, prin prezenţa sa, sub formă de dipicolinat de calciu, are rolul de a modifica conformaţia enzimelor, făcîndu-le mai termostabile. În timpul sporulării se acumulează poli-β-hidroxibutirat care ulterior este consumat. Concentraţia în ATP este foarte scăzută (tabelul nr. 18).

Iniţial, se considera că sporul ia naştere prin deshidratarea formei vegetative, ceea ce explică lipsa metabolismului şi termorezistenţa lui. În realitate, diferenţa dintre spor şi celula vegetativă în ceea ce priveşte conţinutul în apă este mai ales de ordin calitativ, în sensul că în spori numai o mică parte din apă este în stare liberă, restul fiind „legată" de constituenţii celulari (tabelul nr. 19).

Morfologia şi cinetica sporulării. Sporogeneza apare în faza de creştere staţionară, cînd de regulă un nutrient esenţial este epuizat din mediu. Ea poate fi iniţiată de o largă gamă de nutrienţi, absenţi sau limitanţi, şi în primul rînd de cei care servesc drept sursă de C şi N.

În aceste condiţii, rata creşterii şi a diviziunii celulare scade şi se însoţeşte de modificări morfologice, structurale şi biochimice progresive, care — deşi procesul este continuu — pot fi divizate în 7 stadii bine definite (fig. 149), corespunzînd modificărilor morfologice observate pe microelectronografii (Ryter, 1965; Schaeffer, 1969).

În stadiul 0, care corespunde stării de celulă vegetativă la sfîrşitul perioadei de creştere exponenţială, aceasta conţine în mod normal 2 nucleoizi complet separaţi spaţial.

În stadiul I (durata t 0—1,5 ore): cei doi nucleoizi ai celulei vegetative se condensează pentru a forma un singur „filament axial de cromatină", situat de-a lungul celulei.

În stadiul al II-lea (durata 1,5 — 2,5 ore): filamentul de cromatină se separă din nou în doi cromosomi dintre care unul migrează la o extremitate a celulei, unde va fi închis într-un compartiment corespunzător viitorului spor printr-un sept polar rezultat din creşterea inelară (ca un diafragm) — prin invaginarea membranei plasmatice. Rezultă doi protoplaşti inegali, acoperiţi de acelaşi înveliş celular, corespunzînd celuleimamă şi presporului. În compartimentul corespunzător celulei vegetative continuă sinteza de ADN şi substanţe specifice celulei vegetative, în timp

Tabelul nr. 18

Caracterele diferențiale ale sporilor bacterieni și celulelor vegetative (după Brock 1974, modificat)

Caracteristici	Celula vegetativă	Sporul
Structură	bacterie	protoplast sporal, cortex, învelișuri externe etc.
Colorabilitate Gram	Gram-pozitivă	numai cu metode speciale
Refringență	absentă	foarte mare
Rezistență la căldură	mică	mare (cca 10 000 ×)
Rezistență la radiații	mică	mare (cca 100 ×)
Rezistență la acizi și alte substanțe chimice	mică	mare
Rezistență la acțiunea lizozimului	sensibilă	rezistent
Concentrația Ca^{2+}	scăzută	mare
Acid dipicolinic	absent	prezent constant
Incluziuni de poli-β-hidroxibutirat	prezente	absente
Aminoacizi cu S	cantitate mică	cantitate mare
Polizaharide	cantitate mare	cantitate f. mică
Activitate enzimatică	intensă	slabă
Metabolism (consum O_2)	ridicat	f. slab sau absent
Sinteza macromolecule	prezentă	absentă
ARNm	prezent constant	absent sau ±

Tabelul nr. 19

Conținutul în apă liberă al celulei vegetative și al sporului (după Friedman și Henry)

Microorganismul	Apă liberă, în %	
	Celula vegetativă	Sporul
B. subtilis	68,9	3,4
B. megaterium	60,2	4,5
B. mycoides	50,0	11,9

ce în cel al viitorului spor replicarea ADN este inhibată şi se formează substanţe specifice sporale.

În stadiul al III-lea (durata 2,5 — 4 — 5 ore) se formează *protoplastul sporal (prespor)* liber în celula-mamă, acoperit de o membrană dublă, rezultată din creşterea unidirecţională a membranei celulare a sporangiului.

În stadiul al IV-lea (durata 4,5 — 6,0 ore) se formează peretele celular peptidoglicanic al viitoarei bacterii şi cortexul sporal începe să devină refringent. Activitatea metabolică este considerabil diminuată. Începe sinteza de acid dipicolinic.

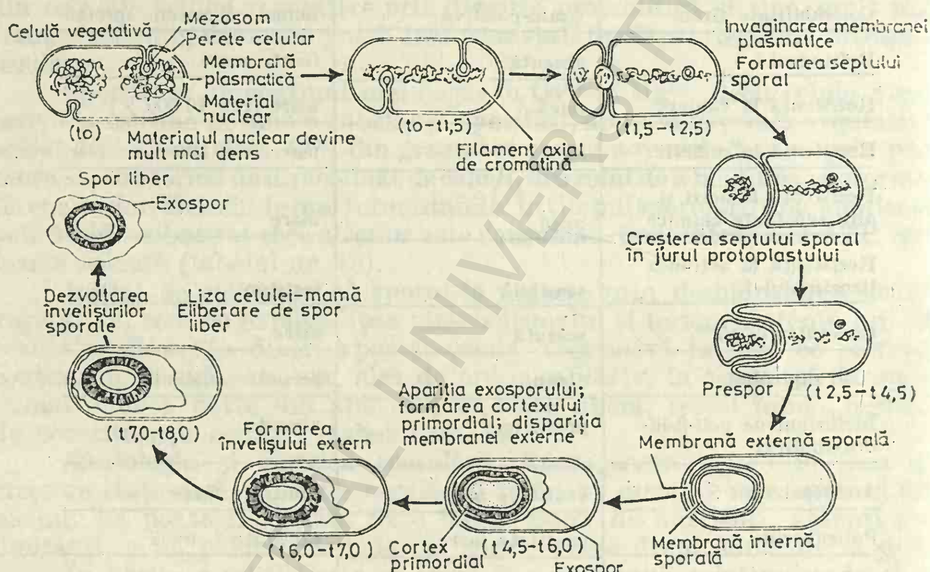


Fig. 149. — Reprezentarea schematică a etapelor de formare a endosporilor.

În stadiul al V-lea (durata 6,0 — 7,0 ore) se formează învelişurile sporale prin depozitarea pe suprafaţa extinsă a cortexului a unor straturi proteice multiple şi încorporarea de cisteină.

În stadiul al VI-lea (durata 7,0 — 8,0 ore) are loc „maturarea" sporului, cu apariţia refringenţei şi a proprietăţilor de rezistenţă. Citoplasma are o structură mult mai omogenă şi electrondensă.

Stadiul VII, care este facultativ, corespunde eliberării sporului din celula-mamă, prin activitatea enzimelor litice sintetizate sau activate de maturarea endosporului.

Fazele de producere a sporogenezei se însoţesc de modificări caracteristice ale compoziţiei chimice şi echipamentului enzimatic, corelate cu evoluţia procesului şi proprietăţile finale ale celulei sporale.

Germinare. Trecerea de la starea criptobiotică, de viaţă latentă (în stadiul de spor), la starea vegetativă, de viaţă activă, se realizează în trei etape succesive, corespunzînd fazelor de *activare*, *germinare* şi *creştere*.

Faza de activare, caracterizată prin modificări în structura macromoleculară, însoțite de mici modificări structurale, determinată de factori de mediu, permite sporului să răspundă la stimulii de germinare. Ea este condiționată de modificarea reversibilă a unor macromolecule specifice. În faza următoare — ireversibilă — se produce modificarea cortexului, urmată de umflarea și alungirea sporului, pierderea refringenței și eliberarea unor substanțe organice de origine sporală în mediu (peptide, dipicolinat de calciu, peptidoglican).

Germinarea este declanșată de expunerea sporilor activați la stimulenți specifici (de exemplu, prezența în mediu a glucozei, acizilor aminați, nucleozidelor etc.). În această fază, stadiul de latență încetează, activitatea metabolică crește, iar rezistența la agenți fizici și chimici dispare. Desfășurarea acestei faze nu este inhibată de antibioticele care inhibă sinteza proteinelor și a acizilor nucleici, ceea ce demonstrează că enzimele răspunzătoare de germinare sînt preexistente în spor.

În ultima fază are loc distrugerea învelișurilor sporale și ieșirea unei noi bacterii, care trece în faza de creștere vegetativă. Aceasta se realizează prin sinteza *de novo* a proteinelor și a constituenților structurali ai celulei vegetative și este influențată atît de factorii care interferă cu producerea de energie în celulă, cît și de antibioticele care inhibă sinteza peretelui celular, a proteinelor și a acizilor nucleici.

Genetica sporulării. Sporularea bacteriilor este un proces morfogenetic secvențial programat, controlat de cca 50 de gene, dispersate în structura cromosomului, care devine ireversibil la scurt timp de la inițiere (după aproximativ 2—3 ore). Dezvoltarea sporului implică un mecanism de tranziție funcțională de la potențialitatea genetică totală a celulei vegetative la o activare selectivă a genelor specifice sporului, însoțită de o represie selectivă simultană a genelor „vegetative" (Szulmajster, 1973, 1975).

Reglarea sporulării la bacterii este negativă : celula vegetativă fabrică un inhibitor sau represor, utilizînd un ingredient din mediu, care împiedică inițierea sporulării. Cînd acest ingredient este epuizat, represia este suprimată, supresia este blocată și celula începe să sporuleze.

Controlul sporogenezei are loc la două nivele : a) la nivelul *transcrierii informației genetice*, asigurînd printr-un mecanism necunoscut exprimarea genelor sporale dispersate de-a lungul genomului, cu formarea unor molecule de ARNm cu viață lungă și b) la nivelul *traducerii informației genetice*, cînd alte mecanisme — deopotrivă necunoscute — permit moleculelor ARNm stabile să fie traduse la ribosomi, în aceeași ordine ca aceea în care sînt exprimate genele respective.

Modificările care apar în cursul sporulării rezultă din stoparea activității anumitor gene „vegetative" și exprimarea altora „sporale", anterior represate, sub influența unui factor inițiator, cu rol de declanșare a sporogenezei, dar a cărui natură nu este cunoscută. Procesul se realizează la sfîrșitul creșterii exponențiale, cînd nivelul cataboliților intracelulari este alterat și, ca urmare, gena care dirijează sinteza factorului de inițiere a sporulării este derepresată.

Trecerea de la creșterea vegetativă la sporulare este caracterizată de un moment critic, dincolo de care adăugarea de nutrienți nu mai poate

împiedica evoluția sporulării (fenomenul de „angajare") (Piggot și Coote, 1976). După Freeze și Fujita (1976), tranziția de la creștere la sporulare s-ar realiza după un mecanism mai complex (ipoteza „multistep") determinat de o serie de modificări în activitatea enzimatică, pool-ul de metaboliți, proteinele structurale etc., care, fiecare în parte, pot fi reversibile, dar asociate devin progresiv mai greu reversibile.

Unele bacterii sporulate formează diferite produse extracelulare utile (de ex., antibioticele polimixina *(B. brevis)*, bacitracina (*B. licheniformis)*, gramicidina *(B. subtilis))* sau unele enzime (proteaze) în strînsă legătură cu faza timpurie (stadiul I) a sporulării. Mutantele blocate în faza timpurie nu mai fac aceste sinteze, în timp ce mutantele blocate tardiv le sintetizeză în mod normal. Aceasta demonstrează că producerea antibioticelor este controlată de gene implicate în fazele precoce ale sporulării. Ca urmare, în celulele vegetative ele sînt expuse acelorași mecanisme de represie ca și genele care controlează debutul sporogenezei.

Importanța producerii de antibiotice și proteaze în cursul formării sporului este evidențiată de faptul că mutantele incapabile să producă aceste substanțe sînt aproape invariabil asporogene. Proteazele joacă un rol important în turnover-ul intracelular al proteinelor. Corelația dintre sporogeneză și producerea de antibiotice nu are în prezent o explicație satisfăcătoare.

Semnificație biologică. Sporogeneza și formarea de forme de latență, în general, ca o alternativă a creșterii vegetative, reprezintă una din strategiile de adaptare a celulelor procariote la un mediu sistematic schimbător și care adesea fluctuează între limite ce depășesc condițiile normale pentru creștere (Dworkin, 1977). Sporul reprezintă o formă de viață criptobiotică sau latentă, capabilă de supraviețuire, uneori foarte îndelungată, și dotată cu capacitatea de a reveni la faza de creștere vegetativă în condiții de mediu corespunzătoare. Mecanismele moleculare ale latenței nu sînt cunoscute. Probabil s-ar datora efectului unor alterări fizicochimice ale enzimelor sporale care duc la o inactivare a lor reversibilă sau prezenței unor inhibitori care le mențin în stare inactivă, asociat cu lipsa unor metaboliți esențiali în celula sporală, ca rezultat al impermeabilității structurilor de înveliș (Keynan, 1972; Dworkin, 1977).

Odată apărut, particularitățile de structură și de funcție permit sporului să se comporte ca o formă de rezistență care păstrează intacte toate caracterele genotipice ale formei vegetative originare și le transmite, ca atare, celulei rezultate din germinarea lui. Sporii au o rezistență mare la căldură, tolerînd uneori expuneri de cîteva ore la 120°C, cîteva minute la 180°C (uneori chiar 2—3 ore la 115°—200°C căldură uscată) și suportă contactul îndelungat cu unele substanțe antibacteriene, rămînînd vii o săptămînă în fenol 5 % și mai multe săptămîni în alcool etc. Rezistența la agenți fizici și chimici apare în diferite faze ale sporulării, concomitent cu modificările în compoziția fizico-chimică a celulei care sporulează. Termorezistența este datorată unor mecanisme complexe care includ sinteza în cursul sporulării a unor macromolecule cu rezistență intrinsecă, stabilizării constituenților sporali prin modificarea lor, conținutului foarte scăzut în apă liberă care face proteinele și acizii nucleici mai rezistenți la denaturare, ca și sintezei masive de acid dipicolinic. În mod similar, rezis-

tenţa la radiaţii, uscăciune şi agenţi chimici, care apare în momentul în care celula devine refringentă, depinde, cel puţin parţial, de proprietăţile proteinelor bogate în cisteină, din învelişurile sporale.

Datorită marii lui rezistenţe şi lipsei aproape complete de metabolism, sporul are o longevitate foarte mare, asigurînd supravieţuirea speciei în natură. Astfel, sporii de *B. anthracis* sînt viabili peste 70 de ani, iar aceia ai unor bacterii saprofite, aflaţi în conserve alimentare, peste 114 ani. După unii autori, sporii şi-ar păstra viabilitatea zeci, sute şi chiar mii de ani. S-au găsit spori viabili în roci scoase de la o adîncime de 37—45 m, ajunşi acolo probabil în era cuaternară, în timpul glacialului (prezenţa iniţială a unui număr de 5—10 spori pe gram de rocă exclude contaminarea ei după recoltă).

Întrucît, cu foarte rare excepţii, într-o celulă bacteriană apare numai un singur spor, iar dintr-un spor se formează numai o singură celulă vegetativă, endosporul bacterian reprezintă, în esenţă, o formă obligatorie de conservarea speciei şi nu de reproducere, ca diferitele tipuri de spori ai fungilor şi actinomicetelor.

Procesele implicate în sporogeneză, ca şi întreruperea latenţei şi apariţia ulterioară a unei celule vegetative reprezintă un exemplu de diferenţiere la organismele unicelulare, iar ca stare criptobiotică forma extremă de răspuns a unui fenomen biologic larg răspîndit, de adaptare la condiţii de mediu foarte variabile.

Sporogeneza reprezintă un model foarte adecvat pentru studiul şi înţelegerea mecanismelor prin care apar în mod ordonat şi sînt reglate evenimentele secvenţiale morfologice şi biochimice ce determină procesele de diferenţiere celulară.

Rhapidosomii

(Pl. 77)

Rhapidosomii (gr. *rhapidos* = baston, *soma* = corp) sînt particule ribonucleoproteice caracteristice, avînd forma unor bastonaşe scurte, rigide, situate intra- sau extracelular dacă sînt eliberate prin liza bacteriei-gazdă. Au fost numite şi *microtubuli* (termen nerecomandat). Descrişi iniţial la *Saprospira grandis* (Lewin, 1963), rhapidosomii au fost găsiţi la numeroase specii de mixobacterii, la *Proteus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces* ş.a.

Cel mai frecvent apar sub forma unor structuri tubulare submicroscopice, cu un canal central în care pătrunde substanţa de contrast electronopacă. Pe secţiuni transversale apar ca un cilindru gol pe dinăuntru, a cărui teacă prezintă 12 pliuri încurbate în spirală. În unele cazuri apar sub forma unor lanţuri rezultate din gruparea cap la cap a mai multor rhapidosomi. Alţii au o structură compactă (dimensiuni 15 × × 300 nm), deoarece canalul este „umplut" cu o structură ce stă ca un fitil într-o lumînare şi care uneori depăşeşte una din extremităţile particulei ca un fel de coadă. „Fitilul" este, la rîndul său, un cilindru gol, cu Ø extern de 8,0 nm şi lungime de 240 nm. Dimensiunile lor variază mult de la o specie la alta (în medie au 25—33 nm × 170 — 225 nm).

Rhapidosomii conţin proteine şi ARN în proporţie de 2 :1 şi prezintă o structură helicală, rezultată din gruparea regulată a unor subunităţi cu ∅ 3,6 nm.

Natura şi semnificaţia lor biologică sînt necunoscute.

Sînt lipsiţi de toxicitate şi neinfecţioşi pentru alte bacterii. Au fost asemănaţi morfologic cu monocinele izolate din *Listeria monocytogense*, care fac parte din categoria bacteriocinelor, sau cu cozile de bacteriofagi, prezente la bacteriile care nu pot face sinteza unor particule fagice complete (multe date pledează împotriva acestor relaţii). Au fost consideraţi ca organite analoge microtubulilor descrişi în celulele eucariote, care au rol în mişcările protoplasmatice sau ca structuri membranare degenerate. Yamamoto, bazat pe localizarea lor în citoplasmă şi pe asocierea lor cu nucleul, consideră că rhapidosomii ar fi implicaţi în fixarea nucleului şi ar servi ca ax, în jurul căruia s-ar produce rotaţia în cursul replicării acestuia. După Shively (1970) ar intra în categoria incluziunilor.

Magnetosomii

(Pl. 78)

Magnetosomii sînt incluziuni care conţin fier şi sînt răspunzătoare de fenomenele de orientare şi migrare descrise la unele bacterii sub influenţa cîmpurilor magnetice slabe (Balkwill şi Blakemore, 1980).

Bacteriile magnetotactice, cu morfologie diferită, au fost izolate din sedimente marine şi de apă dulce, prin introducerea în aceste medii a unor magneţi permanenţi (Blakemore, 1975). Ele înoată într-o anumită direcţie, dirijate de cîmpuri magnetice slabe (0,1—0,5 gauss) sau de cîmpul magnetic al pămîntului.

Magnetosomii nu au fost descrişi în stare dispersată. Ei formează 1—2 lanţuri intracelulare de 5—41 particule, avînd forma unor cuburi cu colţurile rotunjite sau a unor octaedre, cu dimensiuni de 40—100 nm, aşezate în linie dreaptă, longitudinal în raport cu axul mare al celulei, în imediata apropiere a suprafeţei interne a membranei plasmatice. Lanţul reprezintă o structură stabilă caracteristică. După izolarea din celulă, lanţul ia o formă circulară închisă.

Fiecare magnetosom este alcătuit dintr-o zonă centrală bogată în fier, electronopacă, înconjurată de un strat clar (transparent), cu grosimea de 1,6 nm, şi un al doilea strat electronopac, gros de 1,4 nm. Semnificaţia straturilor de înveliş nu este cunoscută. Stratul electrondens extern ar putea constitui o ,,membrană'' similară celor descrise la alte incluziuni sau ar forma împreună cu stratul clar subiacent o membrană biologică tipică.

Particulele care formează magnetosomii dintr-un lanţ sînt fie în contact direct unele cu altele, fie separate de benzi subţiri (3—18 nm) alcătuite probabil din citoplasmă. Configuraţia în lanţ este determinată atît de atracţia dintre particule, cît şi de conexiunile structurale, reprezentate de membranele proteice sau lipidice.

Celulele magnetotactice conţin bucle de membrane intracelulare, derivate din membrana plasmatică, care formează un fel de vezicule, reprezentînd probabil un sistem de depozitare compartimentată a unor componenţi celulari specifici.

Semnificaţie biologică. Magnetosomii conţin fier sub formă de magnetită care poate ajunge pînă la ~ 2 % din greutatea uscată a celulelor bacteriene. Ei acţionează ca o busolă biomagnetică, asigurînd orientarea pozitivă şi deplasarea bacteriilor în cîmpurile magnetice.

Depozitele de magnetită au mai fost descrise şi la alga *Chlamydomonas pleichloris magnetotactica*, ceea ce sugerează posibilitatea intervenţiei lor în răspunsurile de orientare faţă de geomagnetism şi în cazul unor organisme eucariote (Fraenkel şi Blakemore, 1979). Ea poate acumula o cantitate de cristale de zece ori mai mare decît bacteriile. Mecanismul de formare a magnetitei, ca şi avantajele biologice ale capacităţii microorganismelor de orientare în cîmpul magnetic nu sînt cunoscute (Fraenkel, 1982).

Capsula şi stratul mucos

(Pl. 79, 80)

Unele bacterii au proprietatea de a elabora, în anumite condiţii de mediu, un material macromolecular cu caracter vîscos, gelatinos. După unii autori, această proprietate ar exista potenţial la toate bacteriile, dar s-ar manifesta regulat numai la unele specii, în timp ce la altele s-ar traduce doar prin prezenţa unei formaţiuni foarte bine organizate, invizibilă cu mijloacele uzuale de cercetare.

Morfologie şi ultrastructură. Substanţa mucoidă capsulară este mai mult sau mai puţin difuzibilă în mediul înconjurător. În funcţie de structură şi raporturile sale cu celula bacteriană, substanţa mucoidă se poate prezenta sub următoarele forme :

a) *Microcapsula*, cu o grosime sub 0,2 μm, corespunde situaţiei în care substanţa mucoidă alcătuieşte un strat foarte fin în jurul celulei bacteriene, încît este detectabilă prin metode imunologice, nu însă şi prin microscopie (de exemplu, antigenele de suprafaţă care conferă virulenţa bacteriilor patogene).

b) *Capsula* sau *macrocapsula*, cu grosimi depăşind 0,2 μm, se prezintă ca o formaţiune morfologic distinctă şi demonstrabilă prin metode citologice, care înveleşte de jur-împrejur fiecare celulă sau pereche de celule.

c) *Stratul mucos*, masă amorfă neorganizată, ale cărei componente vîscoase se dispun fără semnificaţie anatomică, în jurul celulei bacteriene.

d) *Zooglea* sau *masa zoogleică* — impropriu denumită astfel (gr. *zoon* = animal; *gloea* = substanţă gelatinoasă), în care stratul mucos leagă între ele prin fibrile extracelulare, într-o singură masă, mai multe celule, alcătuind adevărate colonii mucilaginoase de bacterii. Datorită

acestui fapt, în mediile lichide formează flocoane macroscopice, cu margini dendritice, care plutesc liber sau se fixează pe diferite suprafețe. Cantitatea de polimer din zooglee și gradul de floculare sînt influențate de natura mediului și de vîrsta culturii.

Capsula apare la microscop ca un halou incolor în jurul celulei bacteriene. Dimensiunile ei variază foarte mult în raport cu corpul bacterian. Este lipsită de o membrană morfologic diferențiată.

Microscopia electronică a demonstrat că în timp ce la pneumococ, polizaharizii capsulari formează o rețea strînsă, legată de peretele celular, ondulată, pericelulară, la *Klebsiella pneumoniae*, capsula are o grosime de 0,6—0,8 μm și o structură lamelară, alcătuită din straturi suprapuse cu grosimea de 20—25 nm.

Spre deosebire de stratul mucos care formează în jurul bacteriilor o rețea laxă și difuză de exopolizaharid, fără o structură definită, capsula este strîns aderentă de peretele celular, datorită legării polizaharizilor capsulari de peretele bacterian prin legături ionice și uneori prin legături covalente. De aceea, bacteriile capsulate sedimentează prin centrifugare, odată cu capsula, în timp ce la bacteriile cu strat mucos, care par scufundate în polizaharid, bacteriile sedimentează, iar mucusul rămîne în supernatant.

Tomcsik (1954) a arătat că la unele tulpini de *B. megaterium* capsula are o structură complexă, fiind formată din două tipuri de molecule, și anume din polizaharide capsulare sub formă de conglomerate și dintr-o masă polipeptidică în care sînt incluse conglomeratele polizaharidice. La alte tulpini ale aceleiași specii, capsula prezintă de-a lungul suprafeței crestături în formă de zimți care se succed la distanțe regulate.

Datorită indicelui său de refracție foarte apropiat de acela al mediului, capsula este greu de observat prin microscopie directă. Avînd o afinitate slabă pentru coloranți, ea poate fi evidențiată numai prin colorații speciale cu mordansare sau apare ca o imagine negativă după colorarea cu tuș de China (se colorează celula bacteriană și fondul preparatului, în timp ce capsula rămîne ca un halou pericelular incolor și refringent). După colorațiile uzuale ea rămîne, de asemenea, ca un halou incolor. Fiind puțin opacă pentru electroni, capsula nu apare clar sau este chiar invizibilă la microscopul electronic.

Prezența stratului mucos și a capsulei dă culturilor pe medii lichide un caracter vîscos, siropos, datorită difuzării în mediu a unora dintre substanțele capsulare. Coloniile pe medii solide au un aspect umed, lucios, mucoid și dovedesc o consistență mucoasă atunci cînd sînt ridicate cu firul de platină de pe mediu.

Compoziție chimică. Capsula și stratul mucos sînt, în general, de natură polizaharidică, fapt care explică — prin gradul înalt de polimerizare al acestor molecule — atît consistența vîscoasă, gelatinoasă, cît și refringența caracteristică a acestor formațiuni.

În unele cazuri, capsula conține *homopolizaharide* (care au un singur tip de zahăr), cum este la *Leuconostoc* (glucan) sau la unele specii de *Pseudomonas* (levan — polimer de fructoză). În altele însă, capsula conține *heteropolizaharide*, ca la *Pseudomonas aeruginosa* (polimeri de D-glucoză, D-galactoză, D-manoză și acid D-glucuronic). Uneori, compoziția

chimică a capsulei este corelată cu specificitatea antigenică a celulelor respective și permite diferențierea lor serologică în scop de diagnostic. Pe acest criteriu, al unor mici diferențe din compoziția polizaharizilor capsulari la pneumococ, au fost descrise peste 80 de tipuri serologice. La unele microorganisme (*B. anthracis* și alți sporulați aerobi), capsula este de natură polipeptidică (polimeri de acid D-glutamic). Este de semnalat, în plus, că unele specii bacteriene pot elabora simultan atît un strat mucos, cît și o capsulă, cele două tipuri de formațiuni conținînd polizaharide cu compoziții chimice diferite.

Originea capsulei și a stratului mucos nu este încă bine lămurită. Există în prezent mai multe ipoteze în această privință :

— *Ipoteza originii endocelulare.* Capsula nu ar face parte integrantă din celulă, ci ar fi un rezultat al activității metabolice, un produs de excreție sau de secreție, care, datorită slabei lui solubilități în mediu, ar avea tendința de a se depune în jurul celulei. Această ipoteză nu explică în ce mod difuzează prin peretele celular moleculele mari de polizaharide capsulare (de ex., greutatea moleculară a dextranului este 45 000 — 500 000) fără să antreneze la exterior constituenți protoplasmatici cu molecule mai mici.

— *Ipoteza originii parietale.* Capsula ar proveni dintr-o modificare a peretelui celular, care ar suferi un proces de hipertrofie însoțită de gelificarea constituenților săi.

— *Ipoteza originii extracelulare.* Polizaharidele capsulare și cele ale stratului mucos ar fi sintetizate în mediul de cultură sub acțiunea exoenzimelor bacteriene și s-ar depune ulterior pe suprafața celulei. Dovada ar constitui-o faptul că asemenea substanțe pot fi sintetizate și în medii acelulare, ca, de exemplu, în filtratul steril al unei culturi de *Leuconostoc mesenteroides*, unde enzimele care au difuzat în mediu pot cataliza sinteza unor substanțe de tip capsular, identice din punct de vedere chimic cu componentele capsulei care înconjură celula. Deși capacitatea de elaborare a capsulei sau a unui strat mucos constituie un caracter ereditar — determinat genetic — al anumitor specii bacteriene, ea poate să nu se manifeste atunci cînd condițiile de mediu nu sînt cele adecvate biosintezei respective sau poate fi pierdută prin mutație. Pe de altă parte, celulele care nu au această capacitate o pot dobîndi prin recombinare genetică, după ce au primit prin transfer determinantul genetic corespunzător de la o bacterie formatoare de capsulă sau de strat mucos.

Dintre bacteriile care formează capsulă numai atunci cînd cresc pe un mediu conținînd precursorul biochimic direct al materialului capsular, importantă din punct de vedere practic este *L.mesenteroides*. În prezența zaharozei, bacteriile aparținînd acestei specii elaborează o mare cantitate de substanță mucilaginoasă, care se depune pericelular sau difuzează în mediu. Această substanță mucilaginoasă, care este un dextran, poate fi folosită ca substituent de sînge pentru transfuzii. Acest microorganism contaminează materia primă din fabricile de zahăr, unde produce mari pierderi economice, deoarece descompune sucul de sfeclă de zahăr supus prelucrării.

Semnificație biologică. Capsula nu este parte integrantă din celula bacteriană, ci un produs inert, care rezultă din activitatea ei metabolică și care poate fi îndepărtat fără ca viața celulei să sufere.

Protejează celula bacteriană de efectul nociv al desicației, datorită proprietăților sale higroscopice, și poate reprezenta un rezervor pentru stocarea substanțelor nutritive sau a celor rezultate din metabolism; la bacteriile patogene, capsula exercită un rol protector și față de acțiunea fagocitelor, fie direct, împiedicînd adeziunea la suprafața leucocitului, fie indirect, prin efectul chimiotactic negativ — antifagocitar — al substanțelor pe care le conține. Datorită acestui fapt, bacteriile patogene capsulate au o virulență mai mare pentru om și animale, iar pierderea capsulei poate determina pierderea capacității de invazie și a virulenței.

Glicocalixul

(Pl. 80, 81)

Glicocalixul este alcătuit dintr-o masă de filamente polizaharidice atașate de lipopolizaharidele de pe suprafața bacteriilor, formînd în ansamblu o structură ca o pîslă pe suprafața celulei și asigurînd fixarea fermă și adesea specifică a acesteia de alte celule sau suporturi neanimate. În unele cazuri, diviziunea bacteriilor în interiorul unui glicocalix poate produce o microcolonie de celule acoperite de un glicocalix comun.

Glicocalixul este absent în culturile pure de laborator. Se formează numai la celulele aflate în condiții naturale, care apar la microscopul electronic înconjurate de o rețea de fibre, ce aderă unele de altele și de alte celule sau suprafețe inerte. Datorită acestei particularități a fost descris relativ tîrziu (Roth și Sutherland, 1969).

Modul de formare a fost studiat la *Streptococcus mutans*, bacterie implicată în geneza cariilor dentare, la suprafața căreia acționează trei enzime implicate în metabolismul zaharozei: 1) *invertaza* desface zaharoza la glucoză și fructoză, care sînt puse la dispoziția celulei ca sursă de energie; 2) *glucoziltransferaza* scindează zaharoza la fructoză — folosită ca aliment — și glucoză, care este polimerizată sub forma unui lanț lung de glucan, insolubil în apă; 3) *fructoziltransferaza* eliberează glucoza pentru a fi folosită ca aliment și leagă fructoza într-un polizaharid similar, dar hidrosolubil.

Glucanul format aderă de smalțul dentar, iar biosinteza lui continuă datorită prezenței glucoziltransferazei în rețeaua glicocalixului, care se dezvoltă în continuare, capturînd mai multe celule bacteriene din aceeași specie sau din specii diferite, făcînd un depozit gălbui — placa dentară — la nivelul căreia are loc inițierea cariei (fig. 150).

Semnificație biologică. După Costerton (1978), adevărata suprafață funcțională a tuturor celulelor (bacteriene, vegetale și animale) este glicocalixul — rețea ca o pîslă (împletitură încîlcită) de fibre polizaharidice.

La bacterii, această structură este absentă în medii de cultură *(in vitro)*, deoarece în aceste condiții prezența sa nu reprezintă un avantaj

selectiv. Glicocalixul bacterian apare numai în medii naturale competitive, populate de mai multe tipuri de bacterii, în care selecţia favorizează

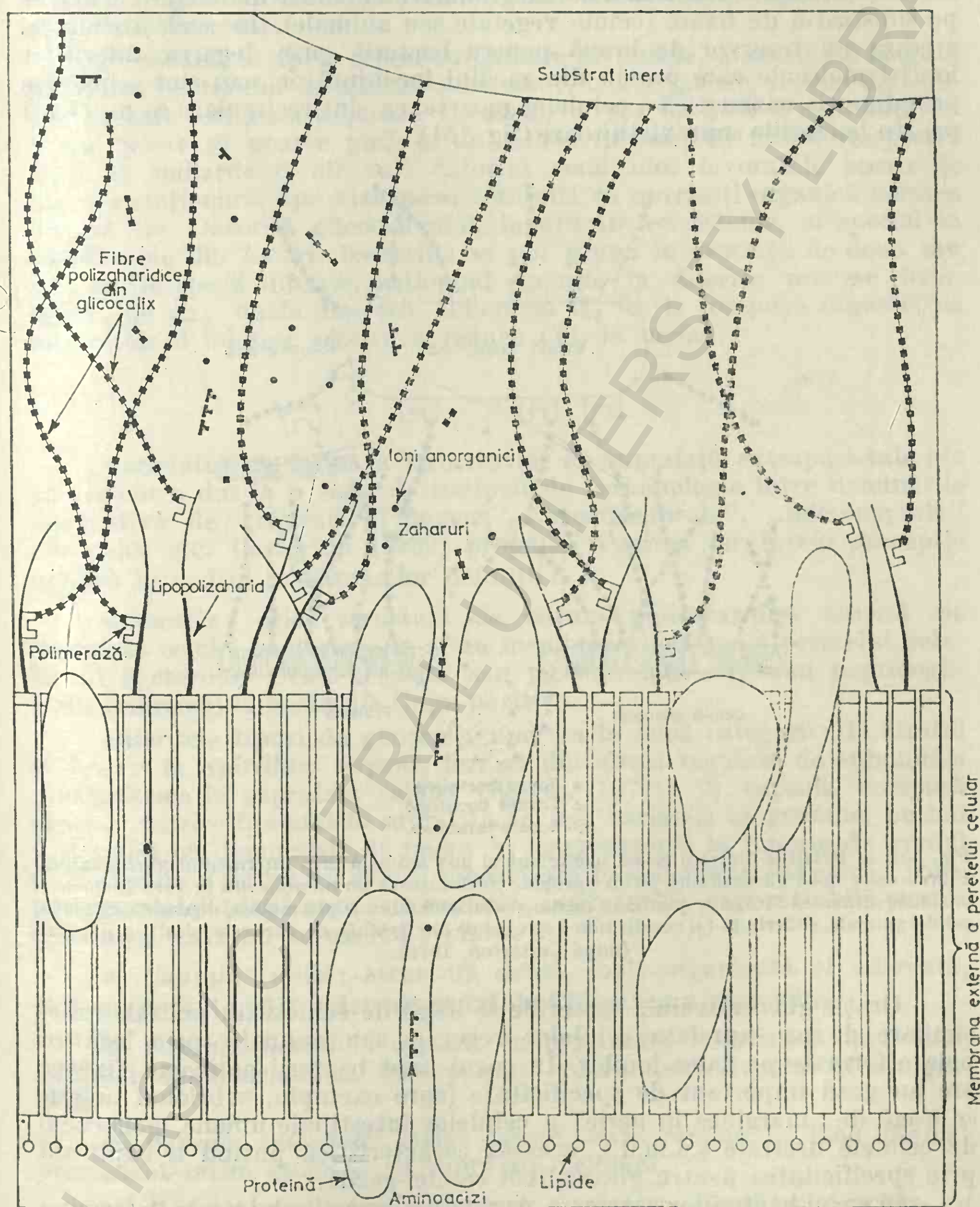


Fig. 150. — Reprezentarea schematică a glicocalixului legat de membrana externă a unei bacterii Gram-negative (după Costerton, 1978).

celulele protejate de glicocalix, capabile să adere prin intermediul lui la diferite substraturi.

Prezența glicocalixului, care determină uneori formarea unei microcolonii bacteriene, creează condiții favorabile de nutriție, prin menținerea și concentrarea enzimelor degradative eliberate de bacterii și active pe substratul de fixare (celule vegetale sau animale). În același timp, el creează un rezervor de hrană pentru bacterii, prin legarea diferiților ioni și molecule care provin din mediul înconjurător sau sînt eliberate prin digestia enzimatică a celulelor moarte, ce sînt recirculate ca nutrienți pentru bacteriile supraviețuitoare (fig. 151).

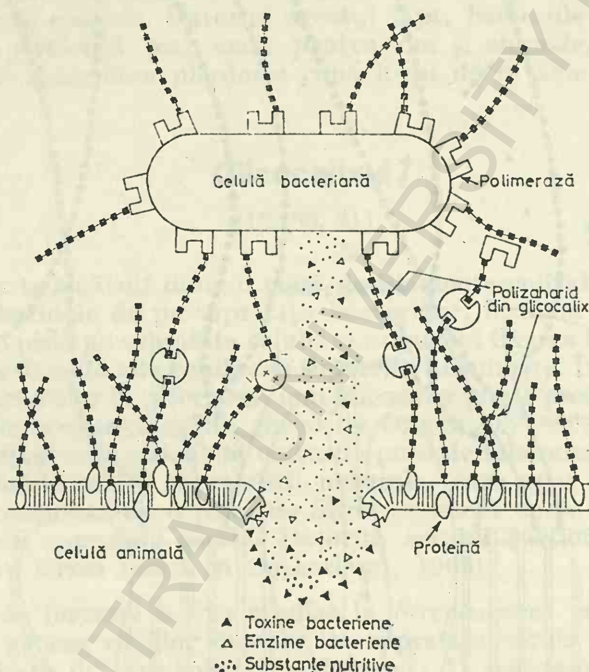


Fig. 151. — Relațiile dintre o celulă bacteriană și una animală prin intermediul glicocalixului. Fibrele celor două glicocalixuri, strîns apropiate, delimitează un micromediu în care toxinele și enzimele difuzează fără să se piardă în mediu și atacă membrana plasmatică, digerind conținutul celulei animale, eliberîndu-l și canalizîndu-l spre celula bacteriană, de care este folosit ca nutrient (după Costerton, 1978).

Grație glicocalixului, bacteriile se leagă de structurile polizaharidice similare de pe suprafața celulelor vegetale sau animale, prin legături polare formate pe calea ionilor. În cazul unor bacterii patogene, fixarea are un grad important de specificitate (spre exemplu, vibrionul holeric se leagă de „marginea în perie" a celulelor intestinale umane, gonococul de celulele uretrale ș.a.m.d.), această caracteristică putînd fi explicată prin specificitatea pentru glicocalixul celulei-gazdă.

În cazul bacteriilor patogene, prezența glicocalixului poate determina un efect protector complex pentru celulă, asigurînd fixarea și menținerea acesteia în mediile naturale sterile (de ex., căile urinare), fără a fi îndepărtată, precum și o rezistență mărită față de bacteriile prădătoare sau de bacteriofagi, ca și față de acțiunea protozoarelor.

Prezența glicocalixului împiedică fagocitarea bacteriilor de către leucocitele polimorfonucleare, ca și fixarea anticorpilor protectori din organismul infectat.

În natură, în apele repezi curgătoare de munte, glicocalixul asigură ancorarea bacteriilor de diferite substraturi inerte (pietre, resturi de lemn etc. pe care formează depozite vîscoase), în așa fel încît o suprafață de 1 cm^2 poate să poarte pînă la un milion de bacterii fixate (respectiv circa 10 miliarde celule/cm^3) datorită condițiilor favorabile create de situația staționară, aprovizionarea continuă cu nutrienți organici, aerarea intensă etc. Datorită glicocalixului, în diferite ecosisteme, în special în sedimentele din lacuri, bacteriile se pot grupa în asociații de două sau mai multe specii diferite, acționînd sinergic în diferite procese fiziologice (de ex., unele bacterii eliberează H_2 de la compușii organici pe care altele îl folosesc pentru a reduce CO_2 la metan).

*

Varietatea de formă a structurilor de suprafață extraparietale ale bacteriilor a dus la o serie de confuzii de terminologie între denumirile descriptive de „capsulă", „mucus", „pseudocapsulă", „microcapsulă" glicocalix etc. Costerton (1982) propune reunirea lor într-o concepție unitară în cadrul următoarelor definiții:

Glicocalix: orice structură de natură polizaharidică situată pe suprafața celulei bacteriene în afara membranei externe a peretelui celular al bacteriilor Gram-negative sau pe suprafața stratului peptidoglicanic (mureină) la bacteriile Gram-pozitive.

Diferitele tipuri de glicocalix aparțin la două categorii: 1) stratul S descris la *Spirillum serpens*, format din șiruri regulate de subunități glicoproteice la suprafața celulei (Sleytr, 1977); 2) capsula compusă dintr-o matrice fibroasă la suprafața celulei, variabilă ca grosime, putînd fi descrisă cu denumirile de micro- și macrocapsulă în funcție de gradul de extindere a structurii sale și subdivizată în mai multe categorii „comportamentale" (după cum este reținută, „eliberată", nepenetrabilă pentru coloranți), care nu se exclud reciproc:

a) *Capsula rigidă*: structură densă, înalt organizată și aderentă, care nu permite pătrunderea tușului de China sau a nigrozinei.

b) *Capsula flexibilă*: capsulă cu organizare moleculară mai laxă, suficient de deformabilă, care permite pătrunderea tușului și a nigrozinei.

c) *Capsula integrată*: strîns legată, care rămîne în mod normal permanent intim asociată cu suprafața celulară.

d) *Capsulă periferică*: structură a cărei prezență și asociere cu suprafața celulară este condiționată de intervenția a diferiți factori de mediu și care, ca urmare, se poate dispersa în mediile lichide. Ea corespunde structurii descrise sub denumirea de glicocalix după concepția lui Sutherland (1972).

Pentru a ilustra această concepţie, Costerton descrie sub denumirea de ,,macrocapsulă periferică flexibilă'' glicocalixul abundent care rămîne în supernatant după centrifugarea bacteriei *P. aeruginosa*, în timp ce cel prezent la *Klebsiella aerogenes*, care rămîne asociat cu celula după centrifugare şi exclude nigrozina şi tuşul de China, este denumit ,,capsulă rigidă integrată''.

Flagelii

(Pl. 82–85)

Flagelii sînt apendice filamentoase, unice sau multiple, dispuse la suprafaţa bacteriilor, reprezentînd organitele de locomoţie caracteristice organismelor procariote. Structuri cu funcţii similare, dar cu o structură caracteristică, mult mai complexă (2 × 9 + 2) (fig. 152), se întîlnesc şi la celulele eucariote la care se numesc *cili* sau *flageli de tip eucariot* (Stanier, 1976).

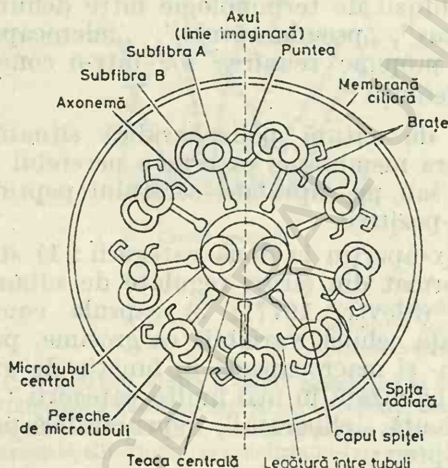


Fig. 152. — Secţiune transversală printr-un cil (eucariote), văzut de la bază spre extremitate, cu evidenţierea structurilor (după Satir, 1974).

Posibilitatea de deplasare independentă nu este o caracteristică generală în lumea bacteriilor, ci se întîlneşte numai la anumite specii. Ea s-a dezvoltat, probabil, odată cu alungirea celulei, fiind prezentă la bacili, vibrioni şi spirili şi numai excepţional la bacteriile sferice.

Morfologie. Flagelii sînt structuri filamentoase, subţiri, flexibile şi fragile, de formă helicală, cu spire de amplitudine neuniformă. Lungimea lor variază în funcţie de specie, dar, în general, este mult mai mare decît aceea a celulelor care îi poartă, ajungînd să atingă la unii spirili pînă la 25–72 μm. Ei sînt mai lungi la celulele bătrîne şi la cele care trăiesc în medii lichide, iar la aceeaşi celulă pot avea lungimi diferite în funcţie de vîrsta lor. La unele bacterii (*Vibrio*, *Bdeldovibrio* etc.), flagelii sînt acoperiţi de o teacă de înveliş.

Forma lor tipică este cilindrică (deşi uneori pot apărea turtiţi ca o panglică), iar diametrul uniform pe toată lungimea filamentului variază de la o specie la alta între 12 şi 25 nm.

Aranjamentul flagelilor pe suprafaţa celulei, ca şi numărul lor (variabil între 1 şi 100) sînt, în general, caracteristice pentru o specie. S-au descris bacterii fără flageli *(atriche*—imobile), cu un singur flagel *(monotriche)*, cu un fascicul de flageli situat la un pol al celulei *(lofotriche)* sau la ambii poli *(amfitriche)*, sau cu numeroşi flageli aşezaţi pe toată suprafaţa celulei *(peritriche)*.

Prezenţa flagelilor poate fi dedusă indirect, observîndu-se mobilitatea bacteriilor în preparate proaspete între lamă şi lamelă, sau poate fi evidenţiată direct, dar numai prin microscopie electronică sau prin colorare cu tehnici speciale, cu ajutorul cărora grosimea flagelilor este mărită pînă la a-i face vizibili la microscopul fotonic, prin depunerea unui precipitat de colorant la suprafaţa lor.

Existenţa flagelilor este controlată genetic şi reprezintă un caracter care poate fi pierdut şi în anumite condiţii redobîndit prin mutaţie.

Ultrastructură. Flagelii sînt alcătuiţi din 3 structuri principale: corpul bazal, articulaţia sau cîrligul şi filamentul helical extracelular.

Corpul bazal este porţiunea cea mai importantă, deoarece funcţionează ca un motor rotativ al cărui ax de transmitere („bastonaşul") este conectat cu filamentul helical printr-un „cîrlig" care serveşte ca articulaţie flexibilă universală (fig. 153).

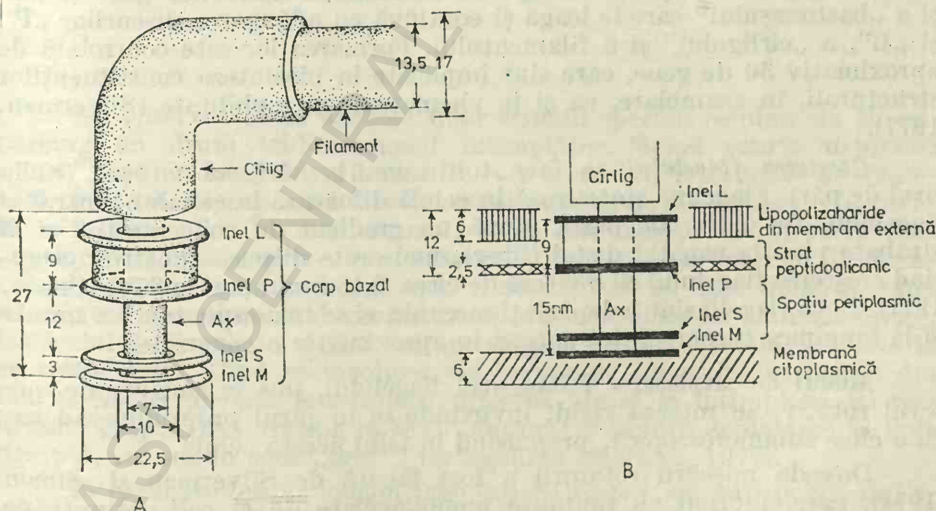


Fig. 153. — Model de structură (A) şi de legare (B) a corpului bazal al flagelului de învelişurile celulare ale bacteriei *E. coli* (dimensiunile în nanometri) (după De Pamphilis şi Adler, 1971).

Structura corpului bazal este mai simplă la bacteriile Gram-pozitive, de ex. la *B. subtilis*, la care este format din două discuri corespunzătoare discurilor „S" şi „M" de la *E. coli* angrenate în aşa fel încît sugerează

aspectul unor butoni de manșetă sau al unor haltere. La bacteriile Gram-negative, structura este complicată prin apariția unor discuri suplimentare avînd rolul de a asigura ancorarea întregii structuri într-un perete celular mai complex.

Astfel, la *E. coli* corpul bazal este alcătuit din 4 discuri interconectate, și anume: 1) discul „M" (de la membrană) dispus în membrana plasmatică și montat rigid pe axul de transmisie, dar care se rotește liber în membrana celulară; 2) discul „S" localizat în regiunea supramembranară; 3) discul „P" inclavat în stratul de peptidoglican și 4) discul „L" legat de membrana externă lipopolizaharidică a peretelui celular. Cuplul de forțe de torsiune care determină rotația axului ia naștere între discul „M" avînd rolul de *rotor*, și discul „S" fixat rigid în peretele celular, în stratul peptidoglicanic, care acționează ca *stator*.

Articulația flexibilă face legătura între axul de transmisie al motorului și filamentul flagelului.

Structura moleculară. Flagelii sînt alcătuiți din cel puțin 11 tipuri de polipeptide. Proteina majoră *(flagelina)* — care în stare monomeră are forma unor particule sferice (izodiametrice) cu ∅ de 4,6 nm și g.m. 40 000 dal și o compoziție în aminoacizi variabilă de la o specie la alta — reprezintă componentul principal al filamentului. Celelalte polipeptide sînt localizate în structura „cîrligului" (1), iar alte 9 proteine diferite în structura corpului bazal (Silverman, 1977). Flagelii se dezagregă la pH 3—4 sau în prezența detergenților și se reasamblează spontan la pH 5,3 — 6,0 în mod simetric, pentru a forma structura tubulară normală.

Morfogeneza flagelilor începe cu asamblarea discurilor „M" și „S" și a „bastonașului" care le leagă și continuă cu adăugarea discurilor „P" și „L", a „cîrligului" și a filamentului. Formarea lor este controlată de aproximativ 30 de gene, care sînt implicate în biosinteza constituenților structurali, în asamblare, ca și în chemotaxie și mobilitate (Silverman, 1977).

Creșterea flagelului se face totdeauna la vîrf, *nu la bază* (ca la firul de păr). Flagelina sintetizată în celulă difuzează în canalul central al flagelului, fie activ, fie pasiv (după un gradient de concentrație) și îl străbate pînă la capătul distal (liber), unde este dispusă simetric, asigurînd creșterea flagelului cu o viteză de circa 0,15 nm/minut la 37°C (Smith, 1971). Dacă flagelii sînt îndepărtați mecanic, ei se refac spontan, ca număr și la lungimea caracteristică speciei în aproximativ o generație.

Modul de deplasare. Filamentul flagelului, pus în mișcare de motorul rotativ, se rotează rigid, învîrtindu-se în jurul propriului său ax, ca o elice submicroscopică, propulsînd în felul acesta celula.

Dovada mișcării rotatorii a fost făcută de Silverman și Simon (1974), care, lucrînd cu mutante monoflagelate de *E. coli* obținute pe medii ce represează sinteza flagelilor, au reușit să fixeze extremitatea liberă a flagelului de o lamă de sticlă și să o imobilizeze cu ajutorul anticorpilor antiflagelari. În aceste condiții, flagelul este împiedicat să se rotească, dar în schimb se rotește corpul celular, alternînd fie între sensul acelor unui ceasornic, fie în sens contrar, cu aproximativ 40—50 rotații pe minut.

Viteza de deplasare este relativ mare, 20—80 μm/s, depășind în multe cazuri de 40 de ori lungimea celulei pe secundă*).

Flagelii nu conțin sisteme enzimatice pentru transformarea energiei chimice în energie mecanică. De aceea, sursa de energie pentru torsiunea rotorului nu este reprezentată de ATP, ci de forța protonmotrice generată de translocația activă a ionilor prin discul „M", pentru a interacționa cu grupările încărcate cu electricitate de sens contrar de pe suprafața discului „S".

Direcția de deplasare a fost observată cu ajutorul unui microscop special „de urmărire" adaptat pentru a putea observa deplasările aceleiași bacterii (fig. 154).

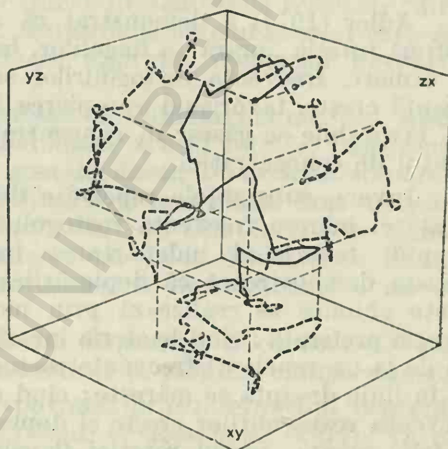


Fig. 154. — „Drumul" parcurs de o celulă de *E. coli* (——) în interval de 30 secunde, evidențiat cu „microscopul de urmărire", și proiecțiile lui bidimensionale în planurile xy, yz și zx (- - - -). Viteza de deplasare ~20 μm/secundă. Bacteria a făcut 26 de drumuri în linie dreaptă și rostogoliri. Cubul format de proiecțiile planurilor respective are latura de 130 μm.

S-a observat că în absența unor stimuli speciali celulele de *E. coli* parcurg un drum tridimensional întîmplător, făcînd scurte deplasări („înot") în linie dreaptă (cu durata de ~1 secundă), întretăiate de schimbări bruște de direcție, consecutive unei mișcări de rostogolire, efectuată în ~0,1 secunde. În mod normal, la *E. coli* flagelii se rotesc în sens „antiorar" (opus acelor unui ceasornic), formînd un fascicul în urma celulei, pe care o propulsează spre a se deplasa în linie dreaptă. Cînd sensul rotirii se schimbă, devenind „orar" (în sensul acelor unui ceasornic), fasciculul de flageli se răsfiră, fiecare trăgînd în altă direcție, și bacteria se rostogolește. Cînd rostogolirea s-a terminat, fasciculul se reface din nou și celula, dirijată într-o nouă direcție, aleasă la întîmplare, își reia drumul drept. Deci, rotația în sens „antiorar" asigură deplasarea în linie dreaptă, iar cea în sens „orar", rostogolirea (Macnab, 1977).

În cazul bacteriilor monotriche sau cu flageli inserați polar, deplasările în linie dreaptă sînt întretăiate de scurte mișcări de recul, determinate de rotația în sens „orar", urmate de reluarea drumului drept într-o direcție aleatorie.

*) Raportată la lungimea organismului, această viteză este fără echivalent în biologie și ar corespunde pentru om la aproximativ 250 km/oră. Chiar animalele care fug repede se deplasează cu viteze incomparabil mai mici (ghepardul de 3 × lungimea corpului/secundă).

Chimiotaxia reprezintă o modalitate de deplasare, orientată preferențial, sub efectul unor concentrații inegale ale unor substanțe chimice în mediu, care exercită un control molecular asupra sensului de deplasare al bacteriilor. Efectul se manifestă fie prin atragerea, fie prin respingerea lor din zonele în care concentrația substanței este mai ridicată.

Există deci substanțe chimiotactic pozitive sau *atractante*, în general utile pentru metabolism (de ex., zaharuri, aminoacizi, O_2, Ca^{2+}, Mg^{2+} etc.), și substanțe chimiotactic negative sau *repelente* (de ex., acizi grași, alcooli, H^+, OH^-, cationi de metale grele), în general nocive sau produși de excreție, indicînd deseori particularitățile unui mediu suprapopulat. Bacteriile răspund la modificări în timp ale concentrației produșilor activi *(gradient temporal)* și la modificări la distanță *(gradient spațial)*.

Adler (1974) a demonstrat că adăugarea de substanțe atractante reprimă rotația „orară" a flagelilor, favorizînd rotația în sens „antiorar". Ca urmare, frecvența rostogolirilor scade, iar durata deplasării în linie dreaptă crește, favorizînd apropierea bacteriilor de zona în care substanțele favorabile se găsesc în concentrație mai mare (bacteria „urcă" gradientul de concentrație).

Invers, substanțele repelente determină rotația în sens „orar" și, ca atare, măresc frecvența rostogolirilor și scurtează deplasările în linie dreaptă, favorizînd îndepărtarea bacteriilor de substanțele nocive. Aceasta demonstrează că deplasările chimiotactice în gradiente de substanțe chimice se realizează prin modificarea drumului întîmplător în direcția preferată : cînd bacteria înoată în direcție „bună" (spre atractant sau de la un repelent) frecvența rostogolirilor scade și, ca urmare, deplasarea în linie dreaptă se mărește; cînd deplasarea se face în direcție „rea" frecvența rostogolirilor crește și deplasarea în linie dreaptă se scurtează. În felul acesta, sensul rotației flagelului ca răspuns la diferiții stimuli chimici stă la baza comportamentului chimiotactic al bacteriilor, iar efectul final este acela că bacteriile se acumulează aproape de sursa de atractant și departe de repelent.

Chemosensorii. Răspunsul chimiotactic al bacteriilor este condiționat de prezența unui *dispozitiv senzorial de chimiotaxie* sau *chemosensor*, alcătuit dintr-un component care „recunoaște" și leagă substanțele detectate numit *chemoreceptor*, și un component *semnalizator* care semnalează flagelului modificarea produsă în mediu.

Chemoreceptorii (componentele de recunoaștere) sînt, de regulă, *proteine de legare* prezente în spațiul periplasmic sau legate lax de membrana celulară, care au funcția de a recunoaște specific anumite substanțe și de a le transporta în celulă.

Celulele bacteriene au pe suprafața lor un număr foarte mare de receptori diferiți, cei mai mulți foarte specifici, avînd afinitate mare pentru 1—2 substanțe și alții cu afinitate mai slabă. La *E. coli* au fost identificați pînă în prezent numai ~30 receptori (18 pentru substanțe atractante și 12 pentru repelenți).

Ei transmit informații referitoare la concentrația substanței active, în funcție de numărul situsurilor active ocupate.

Capacitatea bacteriilor de a răspunde la acţiunea diferitelor substanţe chimice depinde de setul de receptori cu specificităţi diferite de pe suprafaţa lor.

Stimulul iniţial este reprezentat de prezenţa fizică a moleculelor active (chemoefector), care după legare de receptori determină modificări conformaţionale ale acestora, generînd semnale informaţionale ce trec spre mecanismul reglator al rostogolirilor, unde sînt prelucrate de un sistem de semnalizare („maşinăria chimiotactică"), produs a cel puţin 9 gene.

Componenţii care leagă receptorii de reglatorul rostogolirilor sînt numiţi *transductori*. Fiecare proteină transductor interacţionează direct cu o anumită familie de receptori şi transmite semnalele rezultate, direct componenţilor sistemului de reglare. Mutaţiile la nivelul genelor care dirijează sinteza unui anumit transductor suprimă răspunsul mediat de grupul respectiv de receptori.

Conversia informaţiei reprezentată de stimulul chimic din mediul înconjurător într-un semnal care modulează sensul rotaţiei flagelului se realizează printr-un proces controlat genetic, numit *transducţia stimulului*. Procesul are loc foarte rapid şi se realizează în mai multe faze succesive: 1) detectarea stimulului; 2) semnalarea lui; 3) transducţia în semnale purtătoare de informaţie şi transmiterea lor de la o localizare fizică la alta; 4) răspunsul flagelului prin mecanismele de schimbare a direcţiei deplasării.

În acest scop, celula dispune de un dispozitiv de conectare — deconectare, care converteşte stimulii sensoriali în răspuns comportamental.

Sensul rotaţiei flagelului este controlat prin intermediul concentraţiei unor substanţe reglatoare (Aswad şi Koshland, 1977). În mod normal, concentraţia reglatorului oscilează în jurul unei concentraţii-prag, scăzînd din cînd în cînd sub acest nivel. În prezenţa substanţelor atractante, concentraţia semnalului reglator creşte, depăşind un anumit prag, fapt care favorizează rotaţia flagelilor în sens „antiorar" şi deplasarea bacteriilor în linie dreaptă; în prezenţa substanţelor repelente, concentraţia reglatorului scade, provocînd rotaţia în sens „orar" şi rostogolirea bacteriilor. Dovada o constituie existenţa unor mutante bacteriene care se rostogolesc continuu, datorită unei concentraţii a substanţei reglatoare constant inferioară concentraţiei-prag.

În ansamblu, sistemul senzorial al bacteriilor implică participarea a 10 proteine diferite, care leagă ~ 25 de receptori diferiţi cu un organit motor, a cărui asamblare şi funcţie corectă necesită produşii a 30 de gene (Hazelbauer, 1980).

Particularităţile răspunsului chimiotactic. S-a demonstrat că pe măsură ce bacteriile înoată, chemoreceptorii de pe suprafaţa lor controlează în mod continuu concentraţia substanţelor chimice din mediul respectiv. Răspunsul lor chimiotactic este declanşat imediat ce se produce o modificare temporală în concentraţia atractantului sau a repelentului şi este tranzitoriu.

Adăugarea unui atractant la o suspensie bacteriană induce o suprimare imediată a rostogolirilor, ca răspuns la gradientul temporal, în timp ce adăugarea unui repelent induce imediat şi continuu o serie de

rostogoliri. După un timp, variabil de la cîteva secunde la cîteva minute însă, în funcţie de natura compusului şi de mărimea gradientului, bacteriile îşi reiau modul iniţial de „înot" şi rostogolire, chiar dacă atractantul sau repelentul este încă prezent. Aceasta demonstrează că bacteria s-a adaptat la prezenţa continuă a unui stimul. Existenţa adaptării arată că sistemul senzorial bacterian este sensibil mai degrabă la modificările chimice ale mediului, decît la concentraţia absolută a compuşilor activi.

Lucrurile se petrec ca şi cum *E. coli* ar compara mediul chimic anterior cu cel prezent pentru a-şi determina direcţia în care se deplasează, în funcţie de gradienţii spaţiali de substanţe active (de ex., concentraţii mai mari la stînga decît la dreapta).

Sensibilitatea temporală permite bacteriilor să aprecieze modificările locale de concentraţie produse de fluctuaţiile statistice sau cînd substanţele respective sînt sintetizate sau degradate în timp şi să amplifice aceste modificări de concentraţii pentru a face comparaţii pe distanţe mai mari decît lungimea corpului lor. Ele percep variaţiile de concentraţie mai mult decît concentraţiile absolute de substanţe chimice din mediu, au deci un fel de „memorie", care implică o comparaţie dependentă de timp a trecutului şi a prezentului şi care le permite să-şi „reamintească" faptul că mai înainte a existat o concentraţie diferită de cea prezentă. „Memoria" bacteriilor nu este de lungă durată, ca la speciile superioare, dar suficientă pentru a optimiza funcţiile lor biologice. Durata ei, în cazul unei bacterii care înoată într-un gradient, este de $\sim 20-100$ lungimi de corp.

În acelaşi timp, bacteriile sînt capabile să integreze mai multe date senzoriale (semnale) prin adiţia algebrică a stimulilor. Mecanismul central — reglatorul rostogolirilor — primeşte informaţia de la toţi receptorii şi o prelucrează pentru a produce un semnal unitar care controlează direcţia de rotaţie a motorului flagelar.

În cazul în care mediul conţine atît atractanţi, cît şi repelenţi bacteriile „decid" între atracţie sau repulsie în funcţie de concentraţia relativă a celor două substanţe. Deci, ele posedă un *sistem rudimentar de prelucrare a informaţiei*.

Bacteriile sînt capabile să-şi controleze mişcările pentru a-şi optimiza starea fiziologică. Ele „înoată" spre unii compuşi ca nutrienţii favorabili pentru supravieţuire şi se depărtează de substanţele toxice sau nocive. Făcînd aceasta ele sînt capabile să controleze condiţii de mediu analoge cu durerea şi plăcerea la speciile superioare (Koshland, 1977).

Bazele moleculare ale răspunsului chimiotactic. Răspunsul chimiotactic este condiţionat de prezenţa metioninei. Mutantele de *E. coli* incapabile să sintetizeze acest aminoacid migrează în prezenţa unor gradiente spaţiale numai dacă metionina este adăugată în mediu. Kort şi Adler (1975) au demonstrat că răspunsul chimiotactic implică modificarea unui grup de proteine localizate în membrana plasmatică, prin cedarea unor grupări metil de la S-adenozilmetionină — o formă activată a metioninei — pentru a produce esteri carboxilmetilaţi ai anumitor resturi glutamil din proteine.

În celulele nestimulate există un nivel bazal de metilare. Acest nivel se modifică în cursul adaptării bacteriilor la gradiente de substanţe

active. Adaptarea la gradiente favorabile corespunde unei creșteri a metilării, în timp ce gradientele nefavorabile produc o descreștere. Metilarea este produsă de o *metiltransferază* specifică, iar demetilarea de o *demetilază* specifică, produse ale genelor bacteriene *cheR* și *cheB*. În absența uneia dintre aceste activități enzimatice bacteria este incapabilă de chemotaxie normală.

Proteinele de chimiotaxie care acceptă metilarea (PCAM) sînt proteine complexe funcțional și structural. Întrucît ele trebuie să interacționeze cu receptorii situați la exteriorul membranei celulare și cu enzimele metilante și demetilante localizate în interiorul celulei, PCAM străbat membrana și au situsuri de interacțiune atît spre interiorul, cît și spre exteriorul celulei.

Carboximetilarea proteinelor este intim legată de procesul de adaptare al bacteriilor la stimulii chemotactici din mediu și reprezintă probabil mecanismul biochimic esențial al acestei funcții (Hazelbauer, 1980).

Influența factorilor de mediu asupra mobilității eubacteriilor. Aerotaxia. În prezența unui gradient de concentrație a O_2 într-un lichid, deplasarea celulelor bacteriene este orientată într-un anumit mod, determinat de mecanismele producătoare de energie ale celulei. Prin această mișcare dirijată, fiecare bacterie caută zona de concentrație în O_2 adecvată tipului său respirator, ceea ce permite metabolismului său producător de energie să funcționeze cu eficacitate optimă, adică să sintetizeze ATP cu viteză maximă. În această privință există trei tipuri de aerotaxie, corespunzătoare bacteriilor aerobe, anaerobe și microaerofile. Datorită acestei proprietăți, bacteriile mobile strict aerobe pot fi folosite ca indicatori sensibili pentru formarea localizată a unor cantități foarte mici de O_2 (experiența lui Engelmann).

Fototaxia. Bacteriile purpurii mobile, capabile de fotosinteză, răspîndite inițial uniform într-un preparat umed între lamă și lamelă, răspund la prezența unor stimuli luminoși, aplicați într-o zonă strict delimitată a preparatului, acumulîndu-se după 10—15 minute în zona luminată și părăsind zonele întunecate ale preparatului. Odată ajunse în zona luminoasă, ele nu o mai pot părăsi, deoarece orice deplasare spre zona întunecată este urmată de o revenire bruscă, printr-o „mișcare de teroare", spre regiunea luminată. Fototaxia este determinată de necesitatea menținerii la un anumit nivel a vitezei de sinteză a ATP, care este direct proporțională cu intensitatea luminii. Așa-numita „mișcare de teroare" reprezintă un răspuns aproape instantaneu al celulei la scăderea bruscă a vitezei de sinteză a ATP.

Mobilitatea bacteriilor este posibilă uneori și în lipsa flagelilor. Unele bacterii ca grupul *Chloroflexaceae (Chloroflexus aurantiacus)*, *Cyanobacteria (Oscillatoria, Spirulina, Phormidium, Anabaena)* și corespondenții lor apoclorotici *(Beggiatoa* ș.a.), ca și grupul *Flexibacteriaceae (Myxobacteria* și *Cytophaga)* ș.a. se deplasează printr-o *mișcare de alunecare* pe suprafața mediului de cultură solidificat sau la interfața dintre apă și aer,

avînd următoarele caracteristici: este o mişcare de înaintare mai lentă (viteza maximă 150 μm/min) decît cea produsă de flagel, în general paralelă cu axul lung al celulei, uneori de rotaţie într-un anumit sens (spre stînga sau spre dreapta), ca un caracter specific de specie, la unele cianobacterii, asociată cu schimbări frecvente de direcţie şi care poate fi adesea observată la microscop. Are loc numai cînd celulele sînt în contact cu o interfaţă, devenind imobile cînd sînt suspendate liber într-un mediu lichid. Bacteriile mobile prin alunecare lasă depozite de mucus pe drumul parcurs şi urme fine gravate pe suprafaţa agarului. Ele determină o răspîndire a coloniilor pe toată suprafaţa substratului de cultură, putînd acoperi o placă de cultură într-o singură zi sau cel mai frecvent în 1—3 săptămîni.

Bacteriile care alunecă se deplasează sub formă de celule individuale, deşi multe specii tind să se deplaseze în grupări multicelulare, fie ca filamente sau trihoame de celule strîns interconectate, fie ca „roiuri", respectiv mase dense de bacterii, între care predomină asocieri intercelulare strînse, dar temporare (Burchard, 1981).

Spre deosebire de bacteriile flagelate, care se răspîndesc numai pe suprafaţa mediilor umede, bacteriile „roitoare", capabile de alunecare, formează colonii şi pe suprafeţele uscate pe care le acoperă cu o peliculă fină şi delicată vizibilă numai prin iluminare laterală. Coloniile au o formă caracteristică cu margini proeminente dispuse radial sau formînd bucle sau spirale. Coloniile care se răspîndesc au margini caracteristice cu protuberanţe fine, în formă de flacără (Reichenbach, 1981).

Au fost incriminate mai multe mecanisme ipotetice care încearcă să explice mişcarea de alunecare prin intervenţia unor forţe osmotice, de tensiune superficială sau electrocinetice, a secreţiei de mucus, a unor unde sau proteine contractile, a retracţiei fimbriilor sau unor interacţiuni periodice între membrana externă flexibilă şi stratul peptidoglicanic rigid etc. (Doetsch, 1968; Burchard, 1981). Prezenţa unor fibrile periferice cu ∅ de 10 nm la *Cytophaga*, asociate cu stratul intern al învelişului extern al celulei, sugerează posibilitatea participării lor, sub forma unor unde contractile care se propagă de-a lungul axului lor lung.

La *Myxobacterii* au fost incriminate mai multe cauze:

— secreţia de mucus, însoţită de proiectarea mucusului recent sintetizat sub forma unor jeturi, prin porii peretelui celular, situaţi polar;

— existenţa unor proteine fibrilare — helicale, dotate cu contracţii ritmice care ar determina alunecarea microorganismelor într-o direcţie opusă celei în care se produce unda ondulatorie. Datorită acestui fapt, suprafaţa microorganismelor filamentoase nu ar avea un contact continuu cu suprafaţa mediului, ci numai prin zone de contact intermitente.

În sfîrşit, spirochetele se deplasează cu ajutorul unor filamente axiale care se rotesc între corpul celular semirigid şi teaca externă, lax adaptată pentru a permite această rotaţie. Rotaţia în sens orar a filamentelor axiale produce rotaţia corpului celular şi a tecii în direcţie opusă, iar spirochetele se rotesc în jurul axului lor longitudinal, deplasîndu-se înainte. Direcţia de mişcare poate fi schimbată printr-o modificare în sensul de rotaţie a filamentelor axiale.

Pilii şi fimbriile

(Pl. 86, 87)

Pilii sînt apendici filamentoşi, pericelulari ai bacteriilor Gram-negative, în special la tulpinile recent izolate din mediile naturale. Descoperiţi în 1949 de Anderson, ei au fost iniţial denumiţi *filamente* (Houwink şi Van Iterson, 1950), apoi *fimbrii* de Duguid (1955) (l. *fimbria* = franjuri, fibre). Denumirea de *pili* (l. *pilus* = păr) a fost dată de Brinton (1954).

Prea subţiri pentru a fi vizibili la microscopul fotonic, pilii au putut fi evidenţiaţi numai prin microscopie electronică.

Bazat pe particularităţi de structură, funcţie şi determinism genetic, Ottow (1975) împarte aceste structuri în două categorii distincte:

1. *Pili (sau pilii de sex)*, apendice filamentoase neflagelare, reprezentînd calea efectivă de transfer a cromosomului bacterian în conjugare şi acţionînd ca receptori specifici de fagi.

2. *Fimbrii*, apendice neflagelare, neimplicate în transferul ADN cromosomal, viral sau plasmidic.

Fimbriile sînt apendice filamentoase vizibile numai la microscopul electronic, aparent rigide, mai rectilinii decît flagelii, dispuse de obicei pericelular, uneori polar sau bipolar, a căror sinteză este controlată de gene cromosomale. Numărul lor variază între 1 şi 1 000 pe celulă. Duguid a descris şase tipuri de fimbrii morfologic şi probabil funcţional distincte (notate cu cifrele 1—6), iar Brinton le-a grupat pe criterii similare în cinci tipuri (I—V).

Fimbriile sînt structuri tubulare al căror diametru constant pentru un tip dat variază între 3,0 şi 14 nm (în cazuri extreme 25 nm), în timp ce lungimea este variabilă chiar la aceeaşi celulă, fiind cuprinsă între 1 şi 20 µm. Ele sînt alcătuite în exclusivitate dintr-un număr variabil de subunităţi de construcţie identice — moleculele de *fimbrilină* — cu g.m. 16 600 daltoni — formate din 163 resturi de aminoacizi şi asamblate după o simetrie helicală.

Ca şi flagelii, fimbriile cresc lent şi constant prin sinteza intracelulară a fimbrilinei, care apoi este transportată, prin canalul lor central, pînă la extremitatea liberă, unde este depusă. Ca şi pilii, fimbriile rămîn legate de protoplaşti şi sferoplaşti după îndepărtarea peretelui celular, ceea ce demonstrează originea lor intracelulară.

Semnificaţie biologică. Sinteza fimbriilor este controlată de gene cromosomale şi reprezintă un caracter care poate fi pierdut prin mutaţie, fără ca aceasta să afecteze viabilitatea bacteriilor.

Prezenţa lor conferă unele avantaje biologice, legate de creşterea suprafeţei active în absorbţia de substanţe nutritive. De asemenea, activitatea respiratorie a bacteriilor fimbriate *(Fim⁺)* este mai mare decît a mutantelor *Fim⁻* lipsite de aceste structuri. În medii de cultură sărace bacteriile piliate aderă de suprafeţele solide (de ex., sticla), favorizînd preluarea urmelor de substanţe nutritive fixate pe aceste suprafeţe şi permiţînd, în acelaşi timp, degradarea lor prealabilă cu ajutorul enzimelor extracelulare.

Fimbriile sînt prezente în special la bacteriile recent izolate din mediile naturale, cărora le permite să adere de alte organisme și de orice alte substraturi, din care unele pot elibera diferite substanțe nutritive prin liză, excreție sau difuziune. Astfel, ele pot servi ca organite de transport ale unor metaboliți importanți, probabil macromoleculari.

Uneori, ele determină formarea unor pelicule de bacterii reunite prin fimbrii la suprafața mediilor lichide, favorizînd în natură creșterea bacteriilor saprofite din apele stagnante, slab oxigenate în profunzime.

Fimbriile nu pot iniția formarea cuplurilor de conjugare (așa cum fac pilii), dar pot contribui la stabilizarea acestora.

În cazul bacteriilor patogene, fimbriile pot influența virulența acestora prin mai multe căi : a) prezența lor favorizează implantarea bacteriilor în organism, prin fixarea acestora de celule și țesuturi, necesară pentru colonizare și împiedicarea „spălării" lor de către lichidele corpului ; b) în unele cazuri, această proprietate se manifestă cu oarecare specificitate de țesut. Spre exemplu, tulpinile de *Streptococcus pyogenes* izolate din gît aderă de țesutul faringian, nu însă și de celulele intestinale, în timp ce pentru fimbriile de la *E. coli*, situația este inversă ; c) unele antigene din fimbrii induc formarea de anticorpi față de tulpinile virulente, în timp ce altele măresc virulența acestora, conferindu-le o rezistență marcată la fagocitoză.

Pilii, numiți și „pili donor" (Novick, 1976), sînt apendice filamentoase flexibile prezente pe suprafața celulelor (F^+, Hfr și F') la *E. coli K12*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, *Caulobacter* (Ottow, 1975).

Pilii de sex sînt în număr de 1—10 pe celulă și determinați de informația genetică extracromosomală, dintr-o plasmidă de sex. În funcție de aceasta, ei sînt de două tipuri distincte : a) *pilii F* a căror sinteză este determinată de o plasmidă de sex „F" și b) *pilii* I a căror sinteză este dirijată de unii factori *col* de tip special, cu rol de conjugon.

Pilii au o lungime pînă la 20 μm și un diametru mai mare decît al fimbriilor (6,0—15,0 nm). Ei cresc prin același mecanism ca și fimbriile, ajungînd însă lungimea maximă în 4—5 minute.

La microscopul electronic, pilii F apar ca structuri tubulare cu un canal axial, avînd ∅ 2,5 — 3,0 nm, delimitat de un perete alcătuit prin asamblarea după o simetrie helicală a unor molecule de *pilină — fosfoglicoproteină* cu g.m. 11 800 dal. Pilii de tip I apar ca o structură compactă fără canal axial. Extremitatea liberă a unor pili prezintă un buton terminal, a cărui formă și structură pot fi diferite : ca un disc (∅ 15,0 — 20,0 nm), ca o cupă sau caliciu (40,0—80,0 nm), sferică — veziculară, compactă sau cu structură laminară (25,0—70,0 nm).

Semnificație biologică. Pilii asigură legătura directă dintre celulele bacteriene ♂ și ♀ și prin aceasta sînt organite esențiale pentru transferul ADN cromosomal sau plasmidic în cursul conjugării, acționînd fie ca o conductă („pipeline"), fie ca o bandă transportoare (Sokatch, 1977). Îndepărtarea lor de pe suprafața celulelor ♂ duce la pierderea capacității de donator de material genetic a acestora, iar refacerea lor prin biosinteză duce la recăpătarea capacității de conjugare. Pilii și alte antigene de

suprafaţă determinate de plasmida F au rol în fenomenul de excludere (împiedicarea formării de cupluri eficiente între celulele F^{+}) şi, prin aceasta, împiedică participarea lor ca receptori în procesele de conjugare. Unele bacterii din sol formează grupări în formă de stea, datorită legării lor prin intermediul pililor. Este probabil că în aceste grupări ar avea loc şi procese de conjugare (Heuman, 1968).

Pilii poartă receptori pentru fagii fără coadă, asigurînd fixarea fagilor filamentoşi *(fl, fd)* pe extremitatea lor liberă şi a fagilor ARN ♂ *(f2, fr, R17)* pe laturile lor. Această ultimă proprietate este folosită pentru identificarea pililor de sex pe electronografii şi pentru diferenţierea lor de fimbrii. În felul acesta, pilii suplinesc funcţional lipsa ,,cozii'' acestor fagi şi servesc drept conduct prin care se realizează transferul genomului fagic în celula bacteriană.

Există probe după care ADN fagic ar pătrunde în celula bacteriană fie pe calea canalului axial al pilului, fie prin retracţia acestuia înspre peretele celular, aşa cum se întîmplă în special în cazul fagilor filamentoşi cu ADN monocatenar (Bradley, 1967).

Ca urmare, pierderea pililor prin mutaţie are drept consecinţă dobîndirea rezistenţei faţă de infecţia cu fagii respectivi.

„Spinii“

(Pl. 88, 89)

,,Spinii'' sau spiculele bacteriene sînt apendice pericelulare, neprostecate, rigide, tubulare, prezente la anumite bacterii Gram-negative (Easterbrook şi colab., 1973). Au fost considerate iniţial ca un tip aparte de fimbrii (Moll şi Ahreus, 1970). Denumirea lor (l. *spina* = spin) este în acord cu aspectul la microscopul fotonic după colorare cu tehnici de evidenţiere a flagelilor. Numărul lor este variabil, de la 1 la 15 pe celulă (în medie 6), distribuiţi, aparent la întîmplare, perpendicular pe suprafaţa bacteriilor. În cursul prelucrării preparatelor, probabil din cauza forţelor de tensiune superficială, se turtesc şi apar sub forma unor panglici striate.

,,Spinii'' sînt alcătuiţi dintr-un filament, avînd secţiunea de ~ 12 nm, răsucit helical, în aşa fel încît formează o structură tubulară cu ∅ de 65 nm şi lungime variabilă între 1 şi 3 μm. Baza lui are forma unui con şi corespunde la aproximativ 10 ture de filament, avînd la nivelul inserţiei pe suprafaţa bacteriei un diametru de ~ două ori mai mare decît cel al restului tubului. ,,Spinii'' sînt legaţi de suprafaţa membranei externe a peretelui celular, care are o structură absolut normală sub situsul de legare a spinilor, prin intermediul unor proteine. Ei pot fi detaşaţi uşor prin tratare cu proteaze sau prin agitare.

Prin încălzire, filamentele helicale se disociază în subunităţi de natură proteică – corespunzînd moleculelor de spinină (g.m. 37 000 dal), avînd o compoziţie în aminoacizi similară cu a flagelinei şi pilinei (Easterbrook şi Coombs, 1976). La rîndul său, spinina este alcătuită din subunităţi morfologice (oligomere) lungi de 11 nm şi late de 5,6 nm.

Semnificaţia biologică a „spinilor“ bacterieni nu este cunoscută.

Caracteristicile unor grupuri particulare de bacterii

Rickettsiile

(Pl. 90)

Rickettsiile formează un grup de bacterii parazite obligatoriu intracelular, dintre care unele sînt patogene pentru om și animale. Considerate inițial ca un grup de microorganisme intermediare între bacterii și virusuri, rickettsiile aparțin în mod evident lumii bacteriilor prin organizarea lor de tip celular și structura internă a diferiților constituenți, prin complexitatea compoziției chimice, prezența activităților metabolice, multiplicarea prin diviziune și chiar prin natura parazitismului lor, deosebit de parazitismul absolut al virusurilor.

Din punctul de vedere filogenetic, se admite că rickettsiile au fost la origine paraziți naturali ai artropodelor de la care au trecut la mamifere și ulterior la om, prin intermediul vectorilor hematofagi. Acest punct de vedere pare justificat și de faptul că, astăzi încă, rickettsiile se mențin în natură trecînd în mod obligatoriu în organismul unui artropod (insectă, căpușă sau alt acarian) la care de multe ori se transmit ereditar.

Morfologic. Rickettsiile prezintă un pleomorfism foarte accentuat, putînd apărea sub formă de coci izolați sau așezați în perechi, cocobacili, bacili sau chiar filamente subțiri și flexuoase, variabile ca lungime după specie și condițiile de cultivare. Celula tipică are formă de bastonaș cu dimensiuni de 0,3—0,7 μm ×1,5—2,0 μm. Sînt Gram-negative. Se colorează relativ greu cu coloranți de anilină, exceptînd cazul în care se folosesc mordanți sau soluții de colorant în tampon fosfat pH = 7,4.

Structura internă are un aspect general foarte asemănător bacteriilor Gram-negative.

Celula rickettsiană este delimitată de un perete celular cu o grosime de 70—100 nm, alcătuit din 3 straturi concentrice, și dintr-o membrană citoplasmatică trilamelară, groasă de 60—80 nm. Suprafața externă a peretelui este acoperită, la cele mai multe specii, de un strat subțire, microcapsula, care are tendința să se desprindă ușor, sub forma unor fragmente submicroscopice folosite în testele de serodiagnostic *(antigenul solubil)*. În citoplasmă se găsesc diferite structuri cu aspect granular (probabil ribosomi), vacuole și unele particule electronoopace a căror semnificație biologică nu este clarificată.

Compoziție chimică. Rickettsiile sînt alcătuite, ca toate bacteriile, din proteine, glucide, acizi nucleici (ADN în materialul nuclear și diferitele tipuri de ARN în citoplasmă), unele vitamine și săruri minerale, în

proporții care, de asemenea, pledează pentru apartenența lor la lumea bacteriană. Cromosomul este alcătuit dintr-o cantitate relativ mică de ADN în raport cu cel de la *E. coli* (10–20 %), ceea ce reprezintă aproximativ 200–400 de gene (Watson, 1974) și are un raport G + C = 30–45 %. Peretele celular conține acid muramic și acid diaminopimelic, componente caracteristice ale peretelui celular bacterian.

Metabolism. Rickettsiile sînt organisme capabile de activitate metabolică independentă, deoarece au în echipamentul lor enzimatic enzimele necesare atît pentru producerea de energie, independent de gazdă, cît și pentru activitatea biosintetică.

Au capacitatea de a oxida glutamatul, nu însă și glucoza, glucozo-6-fosfatul sau acizii organici. Posedă un sistem de citocromi complet și fac fosforilare oxidativă, utilizînd $NADH_2$ ca donator de electroni. Sintetizează o bună parte din moleculele mici necesare pentru creștere autonomă și pentru formarea macromoleculelor constitutive, preluînd restul de substanțe necesare din celula-gazdă care le furnizează NAD și CoA.

Pentru ca aceste coenzime să pătrundă în celula rickettsiană, membrana acesteia este mult mai permeabilă decît a bacteriilor care trăiesc independent (liber extracelular).

Această permeabilitate foarte mare ar putea explica moartea rapidă a celor mai multe rickettsii în afara celulelor animale. Datorită acestor particularități rickettsiile sînt parazite obligate intracelular și nu se pot dezvolta pe medii de cultură artificiale. Nu se cunosc mecanismele moleculare ce le permit să crească și să se multiplice în citoplasma fagocitelor, care reprezintă, în general, un mediu nefavorabil pentru alte bacterii și nici cauzele parazitismului lor intracelular pentru explicarea căruia au fost emise mai multe ipoteze:

— Deși au metabolism energetic este posibil ca, odată ajunse în celulă, să devină dependente de energia celulară. Ele ar putea folosi ATP endogen propriu pentru activitățile biosintetice și energia produsă de celula-gazdă pentru transportul metaboliților esențiali.

— Învelișul celular ar avea o permeabilitate excesivă, care în mediul extracelular s-ar putea manifesta unidirecțional (de la interior spre exterior), ceea ce ar face viața celulelor imposibilă. Mediul intracelular ar asigura, pe lîngă protecția necesară față de influențele defavorabile, și o ambianță în care metaboliții necesari se găsesc într-o stare de echilibru.

— Parazitismul obligat și imposibilitatea de a cultiva rickettsii pe medii artificiale acelulare s-ar datora unei stări de auxotrofie neindentificată. Fiecare din mediile de cultură — dealtfel destul de puține — folosite pentru cultivare pînă în prezent, ar fi lipsite de un anumit metabolit-cheie în absența căruia rickettsiile nu se multiplică.

— Rickettsiile ar fi organisme dotate cu mecanisme de reglare foarte sensibile. În stare extracelulară ele ar avea activități enzimatice limitate și s-ar comporta asemănător formelor de repaus. Echilibrul dintre fenomenele de inducție, de represie a activităților enzimatice sau de inhibiție prin produs final ar fi mult mai delicat decît la alte bacterii și s-ar fi adaptat cu rigurozitate la particularitățile mediilor intracelulare, care le furnizează

materialele de construcție necesare pentru biosinteză și protecția față de influențele defavorabile ale mediului extracelular (Weiss, 1973).

Multiplicarea rickettsiilor se realizează în mod obișnuit prin diviziune simplă transversală, în citoplasma celulelor atît la vertebrate, cît și la artropode și numai pentru unele specii *(R. rickettsii, R. conorii)* în nucleul celular. În faza de creștere rapidă, în oul de găină embrionat diviziunile se succed la intervale de ~ 8 ore.

În condiții de nutriție necorespunzătoare, rickettsiile încetează să se dividă, crescînd sub forma unor filamente lungi, care ulterior suferă o diviziune multiplă, rapidă, în bastonașe scurte, tipice, dacă se adaugă în culturile de celule o soluție nutritivă proaspătă (Ormsbee, 1957). Imediat după diviziune, celulele rezultate se deplasează rapid în citoplasma celulei-gazdă, putînd înconjura de mai multe ori periferia citoplasmei (nu se știe dacă deplasarea este realizată prin mișcări active sau pasive, mediate de celula-gazdă). Multiplicarea *C. burnetii* se realizează totdeauna în vacuole persistente în celula-gazdă, care se măresc pe măsură ce rickettsiile devin mai numeroase.

Pătrunderea în celulele-gazdă nu este posibilă decît dacă rickettsiile sînt viabile și dacă mediul conține proteine și cationi bivalenți.

În general, multiplicarea rickettsiilor nu produce modificări mari în celulă, pînă în faza finală, cînd aceasta este distrusă.

Pentru multiplicarea lor în laborator se recurge — în funcție de scopul urmărit — la cultivarea pe oul de găină embrionat (care oferă posibilitatea obținerii unor recolte mari de rickettsii pentru studiul și producția antigenelor de diagnostic, vaccinurilor și a cercetărilor de metabolism), la cultivarea în culturi de celule și țesuturi (pentru studiul interrelațiilor gazdă—parazit) sau la inocularea la animale mici de laborator (pentru izolările primare, studii de infecțiozitate și imunogenitate).

Tehnica cea mai satisfăcătoare este aceea de cultivare pe oul de găină embrionat (Cox, 1938) în care — datorită marii susceptibilități — infecția poate fi produsă de o singură rickettsie. Se folosesc, în general, ouă fertile după 5—6 zile de dezvoltare embrionară, în care după 6—12 zile de incubare la 34—35°C (în funcție de concentrația inoculului) se pot obține 10^7—10^9 particule infecțioase/ou pentru *Rickettsia* sp. și 10^{11} pentru *Coxiella burnetii*.

Rickettsiile produc toxine cu efect letal pentru șoarece, la care provoacă moartea în 1—8 ore, cu leziuni vasculare generalizate, însoțite de o mare permeabilizare a endoteliilor capilare. De asemenea, au activitate endotoxică, fapt care sugerează existența unui strat lipopolizaharidic în peretele celular.

Poziție sistematică. Rickettsiile formează, după Bergey (1974), ordinul *Rickettsiales* din clasa *Microtatobiotes* (microtatus = cel mai mic, biote = viață), phylum *Protophyta*. Denumirea de *Rickettsia* a fost dată în amintirea cercetătorului Ricketts, care a murit în urma unei infecții căpătate în timpul cercetărilor sale asupra febrelor exantematice.

Ele sînt grupate în trei genuri :**Rickettsia** *(R. prowazekii, R. typhi* (sin. *R. mooserii), R. rickettsii, R. conorii)*, **Rochalimaea** *(= R. quintana)* și **Coxiella** *(C. burnetii)*. Cel de-al patrulea gen, **Ehrlichia**, are multe caracteristici aparținînd genului *Rickettsia*, dar speciile nu sînt patogene

pentru om. Dintre speciile descrise, cea mai importantă este *E. canis* agentul pancitopeniei tropicale a cîinelui. Un număr mare din speciile descrise — aproximativ 11 — formează grupul rickettsiilor*) patogene care, în afară de diferite artropode hematofage ca păduchele de corp (*Pediculus humanus* var. *corporis*), puricele de șobolan (*Xenopsylla cheopis*), căpușele (*Ornithodorus* sp., *Rhipicephalus* sp., *Dermacentor* sp., ș.a.), parazitează intracelular o serie de mamifere domestice și sălbatice și chiar pe om, la care produc infecții specifice cunoscute sub denumirea de rickettsioze. Face excepție *Rochalimaea quintana* (sin. *Rickettsia quintana*), agentul patogen al febrei de tranșee umane, care crește extracelular în intestin la gazda sa naturală (păduchele de corp) și posibil și la om, ca și pe agar-sînge, dar care nu se dezvoltă decît foarte greu pe oul embrionat sau în culturi de țesuturi.

Rickettsiile patogene au capacitatea de a produce infecții, uneori mortale, la animalele de laborator (șoarece, șobolan alb, cobai), putînd fi obținute în cantități mari din sînge sau diferite organe (splină, glande suprarenale, creier, ficat etc.) ale animalului infectat.

Un comportament aparte are *C. burnetii*, rickettsie cu o rezistență față de agenții fizici (căldură, radiații etc.) sau chimici care depășește cu mult pe aceea a tuturor microorganismelor nesporogene. Își menține viabilitatea mai mult de un an la temperatura camerei (Combiescu și Zarnea, 1950) și suferă o variație de fază, controlată de gazdă, similară variațiilor S și R de la eubacterii.

Tulpinile recent izolate din natură (om, animale domestice sau sălbatice, artropode) se găsesc în faza I. Trecerile repetate pe oul embrionat (8—20 de subculturi) determină conversia la faza a II-a, însoțită de modificări de structură antigenică, patogenitate, imunogenitate, aglutinabilitate, rezistență la fagocitoză etc. Tranziția de la faza I la faza a II-a se face treptat, într-un interval de timp variabil de la o tulpină la alta). Trecerea *C. burnetii*, faza a II-a, pe animale de laborator are drept urmare restabilirea imediată (într-un singur pasaj) a fazei I. Activitatea de fază I este atribuită unui carbohidrat de suprafață. Variația de fază la *C. burnetii* reflectă mai degrabă modificări fenotipice decît genotipice în populația rickettsiană.

Relațiile dintre rickettsiile patogene și artropode depind de gradul lor de adaptare determinat filogenetic. Astfel, infecția păduchelui cu *R. prowazekii* (agentul patogen al tifosului exantematic) are efect letal pentru insectă, în timp ce prezența *R. mooserii* (agentul tifosului murin) este tolerată de purice. În alte cazuri, adaptarea rickettsiilor este atît de perfectă încît, de exemplu la căpușe, ele depășesc limitele obișnuite de localizare (tubul digestiv al artropodelor) și, fără a le afecta în vreun fel, le invadează corpul, multiplicîndu-se în diferite organe și țesuturi și, în plus, transmițîndu-se ereditar la generațiile următoare.

---

*) Termenul comun „rickettsia" (fără inițială majusculă) este frecvent utilizat în sens foarte larg și fără multă discriminare pentru a descrie cele mai mici bacterii, incapabile să se dezvolte pe medii acelulare. El poate fi extins la *C. burnetii* care, deși este foarte deosebită, seamănă cu rickettsiile în anumite privințe și necesită o metodologie similară pentru studiu. Acest statut nu se aplică pentru *Rochalimaea quintana*, care poate fi cultivată pe medii relativ simple bacteriologice, inclusă între rickettsii mai mult pe criterii epidemiologice.

Restul de peste 40 de specii de rickettsii identificate pînă în prezent sînt nepatogene pentru mamifere și sînt întîlnite numai la artropode, la care joacă în special rolul de simbionți.

Artropodele joacă un rol de prim plan în ciclul de viață al tuturor speciilor, mediind transmiterea naturală de la o gazdă vertebrată la alta, iar în unele cazuri jucînd și rolul de rezervor principal al infecției.

Importanță practică. Sînt agenți patogeni ai rickettsiozelor, care la om sînt boli febrile, în general cu exantem. Printre cele mai importante sînt tifosul exantematic, tifosul murin (de șobolan), febra Q (tifosul pulmonar) etc. Agenții lor patogeni sînt transmiși la om prin intermediul artropodelor vectoare, iar în cazul febrei Q în special pe cale respiratorie, digestivă și transcutanată.

Micoplasmele

(Pl. 91, 92)

Micoplasmele reprezintă un grup de celule procariote mici, lipsite de perete celular, delimitate numai de o membrană lipoproteică, cu o compoziție chimică similară celulei animale. Ele reprezintă cele mai mici și mai primitive organisme capabile de creștere autonomă pe medii acelulare.

Micoplasmele formează o clasă aparte *Mollicutes* (moli = moale, pliabil și cute = piele), avînd două genuri : *Mycoplasma* a cărei creștere este dependentă de prezența sterolilor în mediu și *Acholeplasma* care se dezvoltă independent de steroli. Au fost descrise inițial sub denumirea PPLO („pleuropneumonia like organisms" = organisme asemănătoare cu agentul patogen al pleuropneumoniei bovideelor — PPO) (pleuropneumonia organism), primul din acest grup fiind izolat și cultivat de Nocard și Roux (1890).

Morfologia micoplasmelor, ca și modul de creștere și multiplicare fac încă obiectul unor discuții contradictorii, deoarece din cauza lipsei peretelui celular ele au o plasticitate naturală extrem de mare, care a permis interpretări divergente ale datelor de observație. Cu toate acestea, cultivate în condiții de mediu bine definite, fiecare specie are o morfologie caracteristică, încît plasticitatea normală (polimorfismul) nu trebuie confundată cu pleomorfismul, care implică obligatoriu existența a mai mult decît o formă celulară distinctă, în cursul vieții unui organism.

Au fost descrise mai multe tipuri morfologice ca : sferice-cocoidale *(Mycoplasma pulmonis)*, diplococi legați de tubuli membranoși *(M. arthritidis)*, filamentoase *(M. hominis)*, uneori ramificate, „miceliene" sau filamentoase cu structuri terminale *(M. pneumoniae)* și helicale *(Spiroplasma)* etc. (Maniloff și Morowitz, 1972). De foarte multe ori, forma normală poate fi alterată de diferiți agenți fizicochimici utilizați înainte de examinare. Sînt Gram-negative. Dimensiunile lor variază de la 125—250 nm, la formele sferice, pînă la 150 μm la cele filamentoase.

Sînt imobile sau mobile prin alunecare pe suprafețele acoperite cu lichide *(M. pulmonis, M. pneumonie)*, prin mișcări de rotație rapidă și de

flexiune *(Spiroplasma)* sau datorită unui flagel mic, lung și subțire *(Thermoplasma)*.

Ultrastructura lor este extrem de simplă, fiind alcătuite numai din setul minimal de structuri esențiale pentru creștere și replicare : membrana plasmatică pentru a delimita citoplasma, separînd-o de mediul extern, ribosomii pentru asamblarea proteinelor și o moleculă de ADN d.c. pentru a furniza informația necesară pentru sinteza proteinelor.

Membrana plasmatică, de natură lipoproteică (grosime 7,5—10 nm), are o structură triplustratificată, și conține fosfolipide, glicolipide, lipide neutre și glicoproteine; aproximativ 22—26 % din lipidele totale sînt reprezentate de colesterol, care are rolul de a regla fluiditatea membranei în cursul modificării temperaturii de creștere și alterării compoziției în acizi grași.

Lipsa peretelui celular este răspunzătoare de marea lor plasticitate și instabilitate morfologică și de diferite alte proprietăți ca : sensibilitatea osmotică, rezistența la antibiotice care acționează asupra sintezei peretelui celular (penicilina), tendința de a pătrunde și crește în profunzimea mediilor, capacitatea de a traversa fibrele de membrană cu ∅ de 450 nm, care rețin bacteriile cu perete celular.

Materialul nuclear are o structură fibrilară și este alcătuit dintr-o moleculă de ADN d.c. cu g.m. medie de 5×10^8 dal ($4{,}2—6{,}9 \times 10^8$ daltoni la *Mycoplasma* și $7{,}6—11{,}0 \times 10^8$ la *Acholeplasma*, ceea ce corespunde la 600—1 000 gene/celulă. El reprezintă 1/6 din cromosomul *E. coli* și conține cantitatea de informație minimă necesară pentru a asigura reproducerea autonomă a unei celule procariote. Conținutul în (G + C) al ADN este extrem de scăzut (23—30 %), ceea ce impune restricții suplimentare în raport cu necesitățile lor complexe nutriționale și cu modul de viață parazitar (Razin, 1981).

Ribosomii de tip 70 S sînt dispuși la întîmplare sau, la unele specii, în configurații ordonate. Întreaga „mașinărie" de sinteză proteică este de tip procariot, particularitate din care decurge sensibilitatea la cloramfenicol și tetraciclină, antibiotice care inhibă sinteza proteinelor și creșterea micoplasmelor.

Nu au structuri extracelulare, cu excepția speciei *M. mycoides*, care este acoperită cu un strat pericelular de galactan.

Cercetările efectuate pe *M. laidlawii* au dus la descrierea unui ciclu de viață, avînd ca punct de plecare corpii elementari cu aspect caracteristic de sferă mică (∅ 125 — 250 nm), reprezentînd unități minime de reproducere, care cresc treptat pînă formează celule mari, cu formă discoidală sau neregulată, cu ∅ 1 μm, care se scindează fie prin diviziune simplă, fie prin formarea unui număr mare de corpi elementari (Morowitz, 1962). În prezent însă, existența corpilor elementari este contestată întrucît ei nu au fost obținuți viabili și în stare izolată.

Modul de multiplicare este controversat. Boatman (1973), prin studii de cinematografiere a unor celule observate continuu, a demonstrat că multiplicarea se poate realiza la aceeași specie prin diviziune, înmugurire și fragmentarea filamentelor.

În mod normal, diferite forțe din mediu active pe celula plastică a micoplasmelor tinde să le păstreze forma de bază care este cea sferică, la

care modalitatea cea mai frecventă de multiplicare pare să fie diviziunea binară, uneori heteromorfă (inegală) ca înmugurirea. În același timp, în cele mai multe culturi, ca și *in vivo* — în anumite condiții — pot fi observate forme alungite sau filamentoase. Formarea de filamente descrisă la *M. hominis* și alungirea lor cu o rată de 0,5 — 1,7 µm/minut este urmată de transformarea lor prin constricție din loc în loc a membranei celulare într-un lanț de elemente cocoide, ca un șirag de mărgele, care se fragmentează eliberînd elemente sferoidale sau scurte filamente (Bredt, 1973).

După Turness (1970), cele două modalități de diviziune nu ar fi esențial diferite, în sensul că, în cazurile în care diviziunea nucleului și a citoplasmei se produc sincron, procesul apare ca diviziune simplă, în timp ce în cazurile în care diviziunea citoplasmei întîrzie față de replicarea genomului apar filamente multinucleate, care ulterior se fragmentează (Razin, 1978). Procesul de fragmentare este precedat de apariția unor constricții ale filamentelor, precedînd diviziunea citoplasmatică și sugerînd intervenția unor proteine contractile de tipul actinelor (Archer, 1981). Prezența proteinelor contractile ar putea explica și motilitatea complexă (helicoidală rotațională, de flexiune și translație) descrisă la *Spiroplasma* (Razin, 1981) sau alunecarea pe suprafețe umede (Bredt, 1978).

Metabolism. Micoplasmele au capacități biosintetice limitate, care reflectă dimensiunile mici ale genomului și modul de viață parazitar. Ele necesită medii de cultură complexe care conțin infuzie de inimă, peptone, extract de drojdie. Micoplasmele, cu excepția celor din genul *Acholeplasma* și *Thermoplasma*, au nevoie de ser sanguin, care le furnizează acizii grași și colesterolul necesare pentru sinteza membranei plasmatice. Micoplasmele fermentative utilizează glucoza sau alți carbohidrați metabolizabili ca sursă de energie pe calea glicolitică.

Transferul electronilor este efectuat de un sistem respirator redus terminat cu flavine și lipsit de chinone și citocromii (Pollack și colab., 1981).

Micoplasmele nefermentative au ca sursă majoră pentru producerea de ATP degradarea argininei pe calea arginin-dihidrolazei, deși la unele specii au fost descrise și căi alternative (Schimke, 1966; Romano și colab., 1980).

Patogenitate. În condiții naturale, micoplasmele sînt frecvent parazite, instalarea lor persistentă în diferite organisme fiind facilitată de natura chimică a membranei limitante (similară membranelor gazdei), care nu poate fi recunoscută ca avînd caracter străin („nonself").

Ele produc infecții ale căilor urogenitale și respiratorii la om (pneumonie atipică), boli grave la animale (peripneumonia bovideelor, agalactia contagioasă la ovine) și peste 40 de boli ale diferitelor plante (citrice, cartofi, dud etc.).

Sînt frecvent prezente în culturile de celule utilizate în virologie, în care produc modificări cromosomale, fapt care a făcut să li se atribuie un rol în procesele de malignizare. Unele specii sînt totdeauna saprofite (*M. laidlawii*).

Micoplasmele pot fi infectate cu o categorie specială de virusuri, care au unele proprietăți similare bacteriofagilor și altele comune cu virusurile animale (Gourlay, 1970).

Poziția micoplasmelor în lumea vie. Inițial, micoplasmele au fost considerate variante stabile de forme „L”, derivate din bacteriile tipice prin pierderea capacității de a face sinteza peretelui celular. Morowitz și Wallace (1973) consideră că microorganismele actuale ar reprezenta descendenții unor organisme denumite „protocariote” care au precedat separarea dintre procariote și eucariote. După concepția lor, eucariotele nu au derivat din celula procariotă, ci ambele tipuri de celule au derivat din aceleași protocariote, iar evoluția s-a realizat prin dublarea ADN, fapt care a determinat trecerea de la *Mycoplasma* (5.10^8 dal) la *Acholeplasma* (genom cu g.m. 1.10^9 dal). În felul acesta *Acholeplasma* ar fi un microorganism intermediar în evoluția de la protocariote la procariotele cu perete celular.

Datele de biologie moleculară (lipsa oricărei asemănări genetice cu eubacteriile și marea heterogenitate reflectată în procentul bazelor din ADN) pledează pentru considerarea lor ca o clasă aparte și împotriva ipotezelor mai vechi după care micoplasmele ar fi luat naștere din bacterii cu perete celular prin deleție de material genetic (Neimark, 1973).

Biologia micoplasmelor este calitativ aceeași ca a tuturor celulelor procariote. Singurele diferențe sînt de ordin cantitativ și sînt legate de dimensiunile mici ale celulei și ale genomului său. Dimensiunile lineare ale celor mai mari micoplasme sînt numai de două ori mai mari decît ale celor mai mici celule, teoretic posibile (⌀ 0,15 μm). Dimensiunile mici, membrana elastică și natura lor parazitară par să fie principalele proprietăți care le permit să crească fără protecția unui perete celular.

Datorită structurii lor simple și activității biochimice limitate, micoplasmele reprezintă modele experimentale foarte convenabile pentru studiul proceselor biologice și biochimice fundamentale, legate în special de structura și funcția membranelor (Razin, 1978).

Formele „L”

Formele „L” ale bacteriilor, numite astfel după inițiala Institutului „Lister” în care s-a făcut prima observație, au fost descoperite de Klieneberger-Nobel (1935) la *Streptobacillus monilliformis*, fiind considerate ca entități biologice independente, provenite dintr-o contaminare exogenă. Ulterior, asemenea forme au fost descrise și la alte bacterii *(Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacillus*, *Clostridum*, *Neisseria*, *Flavobacterium sp.*, streptococ, stafilococ, sporulați aerobi și anaerobi etc.).

Caracterizate prin absența peretelui celular, formele „L” prezintă, pe lîngă unele aspecte morfologice și caractere de cultură particulare, o mare sensibilitate la variațiile de presiune osmotică, dar pot supraviețui și se pot dezvolta dacă mediul este echilibrat din punct de vedere osmotic. Nu se colorează cu coloranții obișnuiți. Au exigențe nutritive speciale și cresc foarte încet. Sînt rezistente la antibiotice, în special la penicilină. În cazul cînd derivă din bacterii patogene, au în general o patogenitate redusă.

Au fost descrise pînă în prezent trei tipuri de forme „L” :

1. *Formele „L" stabile, de tip A*, care nu se întorc niciodată la forma bacteriană tipică *(formele „L" veritabile)*. Își datoresc această particularitate unei modificări biochimice a peretelui celular (absența unei enzime, modificarea unui situs de acțiune) determinată genetic.

2. *Formele „L" instabile, de tip B*, care păstrează elemente ale peretelui celular, pe care îl pot sintetiza din nou, imediat după îndepărtarea agentului inductor. Ele revin constant la forma bacteriană tipică și corespund sferoplaștilor.

3. *Formele „L" de tip C* (Morrison și Weibull, 1962), care păstrează elemente ale peretelui celular, dar care pierd progresiv capacitatea de revenire la normal.

Compoziția chimică a formelor „L" diferă sensibil de aceea a bacteriilor care le-a dat naștere. Raportul ADN/ARN este mai mare decît la bacteria normală. Concentrația lipidelor și a fosfolipidelor este, de asemenea, mai mare, fapt care conferă o anumită protecție structurilor de suprafață (Pands, 1967).

Metabolismul este similar celui al bacteriei originare, dar considerabil încetinit.

Ca și protoplaștii, formele „L" au capacitatea de creștere, dar numai o foarte limitată capacitate de diviziune și sînt caracterizate prin pierderea receptorilor specifici de fagi.

Mecanismul de multiplicare este foarte controversat. Diviziunea se realizează pe cale directă, în regiunea profundă a coloniei, inclavată în geloză. Elementele nou formate ar fi expulzate la suprafață unde ar forma zona transparentă care înconjură colonia propriu-zisă (Young și Haywood, 1970).

Teoria propusă de Dienes și Klieneberger (1950, 1954), după care formele „L" se pot multiplica prin formarea de *corpi elementari* în interiorul unui *corp mare rotund — globulos* (∅ 5—10 μ), din care se pot elibera prin liză numeroși corpi elementari mici, granulari, nu a fost confirmată de nici unul din studiile recente (Cosenza, Freundt, Clark ș.a., 1964).

Capacitatea de a lua forma „L" este probabil o proprietate generală în lumea bacteriilor și este o consecință a pierderii temporare sau definitive a capacității de a face biosinteza peretelui celular.

Obținerea formelor „L". Aceste forme pot fi obținute spontan (ca la *Streptobacillus monilliformis)* sau prin inducție cu substanțe care distrug peretele celular sau inhibă sinteza sa. Agenții care distrug peretele celular sînt de natură enzimatică și corespund glucozidazelor mucolitice de tipul lizozimului (care rupe legătura ozidică dintre acidul acetilmuramic și acetilglicozamină) și endopeptidazelor (care rup legăturile dintre tetrapeptide). Agenții care perturbă sau inhibă încorporarea în peretele celular a substanțelor răspunzătoare de rigiditatea sa, care alcătuiesc mucocomplexul sînt reprezentați de unii aminoacizi aflați în exces în mediul de cultură (de ex., metionină, glicină, fenilalanină) sau de unele antibiotice (β-lactamine sub forma unor concentrații mici de penicilină, cefalosporine,

cicloserină etc.). În geneza acestor forme au mai fost incriminaţi diferiţi alţi factori nefavorabili din mediu, cum ar fi bacteriofagii, radiaţiile, anumite substanţe chimice, anticorpii specifici.

Pot apărea şi spontan în natură, în acest caz specia bacteriană de origină fiind necunoscută.

Coloniile formelor ,,L", ca şi elementele care le constituie au aceaşi morfologie, indiferent care este natura bacteriilor din care provin. Coloniile sînt foarte mici, cu ∅ de 20–50 μm, slab delimitate, încrustate în geloză la nivelul zonei lor centrale, care este densă şi opacă. Creşterea lor se face în profunzimea mediului, iar centrul coloniei este înconjurat de o aureolă caracteristică, transparentă, cu contur fin dantelat.

Semnificaţie biologică. Unele cercetări au sugerat că formele ,,L" ar avea un rol în patologia umană, ca elemente răspunzătoare de persistenţa cronică *in vivo* sau de apariţia recăderilor în cursul unor infecţii osoase cronice cu stafilococi, a pielonefritelor şi a unor endocardite. Acest rol este încă controversat.

Datorită absenţei peretelui celular, formele ,,L" sînt rezistente faţă de antibioticele care acţionează asupra biosintezei peretelui celular şi, din contră, mult mai sensibile decît bacteriile normale faţă de antibioticele care acţionează la nivelul citoplasmei bacteriene, datorită mai marei accesibilităţi a acestora faţă de ţinta lor de acţiune.

Există însă dificultăţi decurgînd din faptul că există tendinţa de a grupa, uneori abuziv, sub denumirea de forme ,,L", diferite organisme cu aspect globulos, oricare ar fi modul lor de obţinere. Deoarece formele ,,L" ale bacteriilor au multe trăsături comune cu micoplasmele, iniţial acestea au fost considerate ca forme ,,L" apărute spontan în natură din celule de eubacterii, sub acţiunea unor condiţii fiziologice speciale sau ca rezultat al unei mutaţii comportînd pierderea capacităţii de sinteză a unor constituenţi. Datele recente au infirmat această ipoteză. Micoplasmele reprezintă un grup aparte de microorganisme, deoarece genomul lor este mult mai mic decît cel al eubacteriilor şi formelor ,,L" şi, în plus, nu există omologie genetică între ADN izolat din micoplasme şi cel aparţinînd variantelor ,,L" ale eubacteriilor.

Chlamidiile

(Pl. 93)

Chlamidiile sînt organisme procariote care parazitează obligat celulele eucariote, producînd infecţii şi boli la om şi animale. Aparţin ordinului *Chlamydiales* (fam. *Chlamydiaceae)* — genul *Chlamydia*, avînd două specii : *C. trachomatis* şi *C. psittaci*. Prin tehnica hibridării moleculelor de ADN s-a demonstrat că cele două specii nu prezintă omologie genetică, fiind derivate probabil din doi strămoşi diferiţi.

Considerate iniţial ca virusuri, datorită parazitismului lor obligat, chlamidiile sînt în realitate bacterii, care îşi menţin structura celulară procariotă de-a lungul întregului lor ciclu de viaţă (tabelul nr. 20).

Tabelul nr. 20

Caracteristicile comparate ale chlamidiilor, eubacteriilor şi virusurilor (după Schachter şi Caldwell, 1980)

Caracteristici	Chlamydia	Eubacteria	Virus
Mărimea (nm)	~ 350	300—3 000	15—350
Forma	cocoid	diferită	simetric la nivel molecular
Obligat parazit intracelular	+	—	+
Acizi nucleici	ADN şi ARN	ADN şi ARN	ADN sau ARN
Perete celular complex	+	+	—
Acid muramic	—	+	—
Mod de reproducere	Ciclu complicat şi diviziune	Diviziune	Replicare
Sensibilitate la sulfamide şi antibiotice	+	+	—
Ribosomi	+	+	—
Enzime de metabolism	+	+	—
Producere de energie	—	+	—

Morfologie. Ciclul de viaţă al chlamidiilor (fig. 155) este iniţiat de *corpii elementari*, formele extracelulare stabile, cu viaţă latentă, care după ce intră în citoplasma celulei-gazdă, dau naştere unor structuri vegetative — *corpii reticulaţi* — din care se formează noi corpi elementari, capabili să reiniţieze ciclul de infecţie.

Corpii elementari au forma unor mici bacterii cocoidale (∅ 0,2—1,5 μm) delimitate de un perete celular similar ca structură şi compoziţie chimică cu cel al bacteriilor Gram-negative şi de membrana celulară. Conţin citoplasmă şi ribosomi, iar în zona centrală un nucleoid compact.

Genomul este alcătuit dintr-o moleculă de ADN d.c. circular închis cu g.m. 660 $\times 10^6$ dal (conturul 345,5 μm). El este alcătuit din peste 600 de gene şi reprezintă circa 25% din genomul *E. coli* (Higashi, 1975).

Corpii elementari se colorează inconstant Gram-negativ şi foarte bine în roşu cu coloraţiile Gimenez sau Macchiavello şi în purpuriu cu Giemsa.

Chlamidiile pot fi cultivate în anumite linii celulare şi în sacul vitelin al ouălor de găină embrionate de 6—7 zile, la 35°C, omorînd embrionul după 4—12 zile de la infecţie.

Ele conțin enzime pentru sinteza ADN, ARN și pentru metabolismul glucozei, care sînt activate după intrarea corpilor elementari în citoplasma celulei-gazdă, dar sînt incapabile să producă compuși macroergici (ATP) pentru stocarea și utilizarea energiei („paraziți de energie").

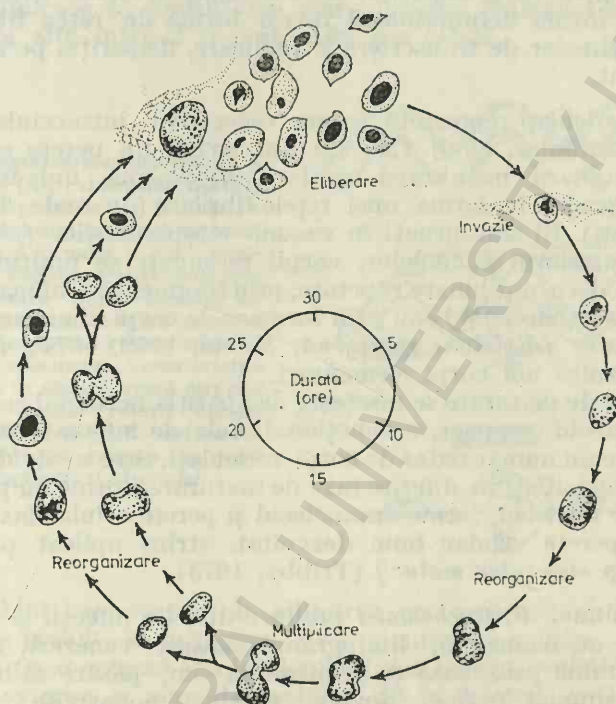


Fig. 155. — Ciclul de multiplicare la *Chlamydia psittaci* — reprezentare schematică (după Moulder, 1964).

Relații cu celula-gazdă. Infecția celulei-gazdă se produce prin fagocitoză, după o prealabilă legare electrostatică de membrana celulară, urmată de interacțiunea cu receptori specifici celulari (resturi de acid sialic). Chlamidiile formează cu celula-gazdă un ecosistem echilibrat în tot cursul ciclului lor de viață, echilibrul rupîndu-se cînd ciclul este completat.

Parazitismul obligat este condiționat de prezența mitocondriilor active în celula-gazdă, de unele funcții nucleare încă nedefinite, de aprovizionarea constantă cu aminoacizi și de alți factori de creștere esențiali. Parazitul utilizează metaboliții celulei-gazdă, intră în competiție cu aceasta pentru aminoacizi și sintetizează metaboliți toxici, care duc la leziuni celulare și, în final, la ruperea membranei celulare și eliberarea corpilor elementari progeni. În lipsa aminoacizilor esențiali în cantitate suficientă, chlamidiile trec în stare de latență intracelulară (Becker, 1978).

Evoluția infecției intracelulare cu *C. psittaci* a permis evidențierea, după circa 12 ore de la infecție, a unor structuri bacteriene mari, situate în interiorul unei vacuole citoplasmatice, corespunzînd corpilor reticulați în

curs de dezvoltare. Corpii reticulaţi iau naştere în citoplasma celulei infectate prin trecerea corpilor elementari din faza latentă în faza vegetativă. printr-un proces similar cu diviziunea binară.

Activarea corpilor elementari se însoţeşte de modificări structurale importante, ca de ex. : dispariţia nucleoidului, trecerea genomului ADN compact din forma nefuncţională într-o formă de reţea fibrilară, laxă, accesibilă enzimelor de transcriere şi replicare, dispariţia peretelui celular foarte evident.

Corpii reticulaţi reprezintă forma vegetativă, intracelulară, neinfecţioasă a chlamidiilor, cu ∅ 1,0–1,6 µm, avînd un perete celular foarte subţire şi fragil, o membrană celulară, citoplasmă, numeroşi ribosomi 70 S şi un genom în forma unei reţele fibrilare (de unde denumirea de corpi reticulaţi). Ei sînt situaţi în vacuole citoplasmatice *(corpi de incluziune)*. În interiorul vacuolelor, corpii reticulaţi se multiplică cel mai frecvent prin diviziuni binare repetate, prin fragmentare în mai mulţi corpi mici *(diviziune polizonală)* sau prin formare de corpi miniaturali, rezultaţi prin înmugurire *(diviziune sporogenă*, Mitsui, 1962, 1971), din care, prin maturare, rezultă noi corpi elementari.

Procesul de maturare se însoţeşte de apariţia peretelui celular distinct şi a unui nucleoid compact, nefuncţional. Celulele infectate prezintă după circa 30 de ore un număr redus de corpi reticulaţi, care se divid, şi numeroşi corpi elementari aflaţi în diferite faze de maturare (forme cu perete celular lax, lipsite de nucleoid, forme cu nucleoid şi perete celular lax şi forme cu nucleoid şi perete celular bine dezvoltat, strîns aplicat pe membrana celulară *(corp elementar matur)* (Tribby, 1973).

Patogenitate. *C. trachomatis* produce diferite infecţii la om (trahom, conjunctivite cu incluziuni, limfogranulomatoza venerică, uretrite). *C. psittaci* determină psittacoza şi ornitoze la om, păsări sălbatice şi domestice, pneumonii (ovine, bovine, porcine), poliartrite (viţel, porc), enterite etc.

Spirochetele

(Pl. 94–96)

Spirochetele sînt bacterii chemoheterotrofe caracterizate printr-o anatomie celulară şi un tip deosebit de mobilitate fără echivalent în lumea procariotelor.

Morfologic. Celulele sînt de formă helicală şi au ca principal component structural *cilindrul protoplasmic (protoplastul helical)*, care este alcătuit din constituenţii citoplasmatici şi nucleari, înconjuraţi de membrana plasmatică şi peretele celular.

Dimensiunile lor variază între 0,1–0,2 × 5 – 6 µm pentru spirochetele mici şi 0,75–3 × 80 – 500 µm pentru cele mari.

Forma diferă în funcţie de lungimea de undă şi amplitudinea de undă a celulei, regularitatea răsucirii lor şi de conformaţia capetelor celulei care pot fi rotunjite, conice sau aproape ascuţite. Forma helicală este

menținută de stratul peptidoglicanic al peretelui, care păstrează această formă și după ce este obținut în stare pură, prin îndepărtarea conținutului celular. În jurul cilindrului protoplasmic helical sînt încolăcite niște structuri filamentoase, cunoscute sub mai multe denumiri ca: *fibrile periplasmice* (Canale-Parola, 1978), *fibrile* sau *filamente axiale*, *axostil* (Starr, 1965) etc., implicate, în motilitatea spirochetelor. Numărul lor variază de la o specie la alta între 2 și peste 100 per celulă.

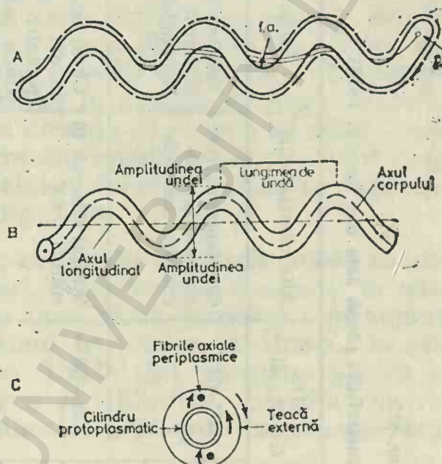


Fig. 156. — Reprezentarea schematică a unei spirochete (A), evidențiind fibrilele axiale (f.a.) și punctele lor de inserție (p.i.), amplitudinea și lungimea de undă în raport cu axul corpului și axul longitudinal (B). C. Secțiune transversală care explică motilitatea după modelul lui Berg: cele două filamente axiale se rotesc în sens orar, producînd rotirea corpului celular, dar în sens invers. Teaca externă laxă se rotește în direcție opusă corpului celular. Suma acestor rotații într-un organism helical asigură deplasarea înainte a celulei prin rotație în jurul axului longitudinal al celulei.

Ansamblul reprezentat de cilindrul protoplasmic și fibrilele periplasmice este învelit, în întregime, de o membrană subțire, triplustratificată, numită *teaca externă* sau *învelișul celular extern*, probabil echivalentă membranei externe a peretelui celular de la bacteriile Gram-negative (Canale-Parola, 1977). Alcătuită din proteine (60—70 % după specie), lipide (4—25 %) și glucide (1—27 %), această structură ar funcționa ca o membrană semipermeabilă (fig. 156).

Datorită prezenței tecii externe, fibrilele periplasmice, care sînt asemănătoare flagelilor ca structură și compoziție chimică, sînt, spre deosebire de aceștia, structuri endocelulare, localizate în spațiul delimitat de peretele celular și teaca externă. Fibrilele periplasmice au o ultrastructură similară flagelilor, fiind formate dintr-un dispozitiv de ancorare în învelișurile celulare, alcătuit dintr-un număr de discuri bazale, un „cîrlig" situat proximal față de inserția pe corpul celular și o porțiune filamentoasă cu ∅ de 15—25 nm, care pe electronografii apare formată dintr-un „sîmbure" central înconjurat de o teacă nestriată.

Spirochetele au totdeauna cîte două seturi de fibrile, avînd fiecare un capăt ancorat aproape de un pol al celulei, în timp ce capetele distale sînt totdeauna libere. Ele se întind de-a lungul celei mai mari părți din lungimea celulei, în jurul căreia sînt încolăcite și se extind dincolo de regiunea ecuatorială a celulei. În felul acesta, fibrilele ancorate la polii opuși ai celulei sînt adiacente unele față de altele și se suprapun în regiunea centrală a celulei, dînd impresia unui filament continuu. În unele cazuri, extremitățile distale (libere) ale fibrilelor depășesc extremitățile cilindru-

Tabelul nr. 21

Genurile de spirochete și principalele lor caracteristici (după date din Bergey, 1974)

Genul	Specia tip	Morfologie	ADN G+C mol %	Alte caracteristici	Habitat și patogenitate
Spirochaeta	*S. plicatilis*	Celule helicale; cilindrul protoplastului răsucit în jurul sau odată cu fibrilele axiale; 2—40 fibrile periplasmice 0,2—0,75 × 5 — 45 μm, extreme 500 μm	50—60	Chemoorganotrofe obligate sau facultativ anaerobe	Trăiesc liber în natură în ape și nămol. Nepatogene
Treponema	*T. pallidum*	Formă plată, extrem de fin ondulată; foarte subțire 0,2 μm Ø; 2—15 fibrile axiale; 0,2—0,5 × 5—20 μm	32—50	Obligat anaerob în culturi pure	Gură, tract intestinal și genital la om și animale. Comensale sau parazite. Unele patogene
Borrelia	*B. anserina* (sin. *Spirochaeta gallinarum*)	Formă helicală; 5—7 ture de spiră cu amplitudinea de 1 μm, 0,2—0,5 × 3 — 15 μm.	—	Anaerobe sau microaerofile	Parazite. Unele patogene pentru păsări (*B. anserina*) sau pentru om, (*B. recurrentis*) transmise prin păduchi sau căpușe (febre recurente)
Leptospira	*L. interrogans* *L. icterohaemorrhagiae*	Celule fine, Ø 0,1 μm, spiralate cu spire strînse și extremități îndoite în cîrlig; 0,1—0,2 × 6 — 20 μm;	36—39	Obligat aerobe	Libere la suprafața apei și solului. Parazite și frecvent patogene pentru om și animale
Cristispira	*C. pectinis*	Celule spiralate mari 0,5—3,0 × 30—150 μm; 3—10 ture complete de spiră; peste 100 fibrile axiale	—	Nu cresc în cultură pură	Trăiesc în stilul cristalin și în lichidul tractului digestiv la moluște de apă dulce și marine

lui protoplasmic, dînd impresia unor flageli externi. Compoziţia lor chimică este asemănătoare flagelinei.

Datorită asemănării ultrastructurale şi chimice cu flagelii, fibrilele periplasmice au fost implicate în mobilitate, deşi mecanismul prin care acţionează este necunoscut. Ele s-ar îndoi activ, determinînd mişcări neîncetate de îndoire, propagări de unde şi contracţii ale corpului celular.

După modelul lui Berg (1976), elaborat pe *Spirochaeta plicatilis*, mobilitatea spirochetelor s-ar realiza prin rotaţia fibrilelor periplasmice care ar antrena rotaţia în sens invers a cilindrului protoplasmic helical în interiorul tecii externe. La rîndul său, acesta din urmă fiind liber, ca un manşon pericelular, se rotează într-o direcţie opusă rotaţiei cilindrului protoplasmic. În felul acesta, schimbările în direcţia de rotire a fibrilelor periplasmice antrenează modificări în direcţia de rotire a cilindrului protoplasmic, iar spirochetele suferă o rotaţie rapidă în jurul axului lung al corpului, însoţită de flexiuni ale celulei, datorită cărora se deplasează, „înşurubîndu-se" în mediul lichid (fig. 156).

Ecologie. Spirochetele sînt larg răspîndite în diferite medii naturale. Unele trăiesc liber în apele din lacuri, rîuri, mări şi oceane şi în nămol, altele fac parte din flora indigenă a unor gazde eucariote: pe suprafaţa corpului unor protozoare, în intestinul termitelor, în rumen, în şanţul gingival şi colonul mamiferelor etc. Unele sînt patogene pentru om: *Treponema pallidum* (agentul patogen al sifilisului), *Borrelia recurrentis* (febra recurentă) sau pentru om şi animale: *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* etc. (leptospiroze).

Pe baza unor criterii morfologice, fiziologice şi ecologice, spirochetele au fost împărţite în 5 genuri, ale căror proprietăţi sînt redate sintetic în tabelul nr. 21.

Mixobacteriile

(Pl. 97, 98)

Mixobacteriile sînt microorganisme procariote care prezintă un ciclu de viaţă cuprinzînd secvenţe de dezvoltare complexă şi procese rudimentare de comunicare intercelulară (Dworkin, 1975). Ele se deosebesc de alte bacterii prin două proprietăţi, una neobişnuită, reprezentată de natura mobilităţii (întîlnită numai la cianobacterii şi flexibacterii), şi alta unică, reprezentată de capacitatea de a dezvolta un ciclu de viaţă care implică morfogeneza celulară şi colonială.

Morfologie. Celulele vegetative au forma unor bacili mici, uniform cilindrici sau cu extremităţile ascuţite, avînd structura celulară tipică bacteriilor Gram-negative, fără flageli, inclavaţi într-un strat de mucus ± consistent.

Se deplasează în mod caracteristic prin alunecare pe suprafaţa mediului, lăsînd în urma lor dîre care sînt folosite preferenţial de alte celule.

Ele formează pe agar colonii plate care se răspîndesc radiar de la locul de inoculare. Marginea coloniei este foarte neregulată deoarece

celulele de aici se mișcă mult mai rapid decît cele din interior și se desprind frecvent, alunecînd în afara coloniei, pentru a se reîntoarce în corpul ei (fenomenul de „roire").

Ciclul de viață. Natura mediului nutritiv joacă un rol determinant asupra modului de evoluție a mixobacteriilor (fig. 157). În funcție de concentrația substanțelor nutritive, mixobacteriile au două posibilități de evoluție:

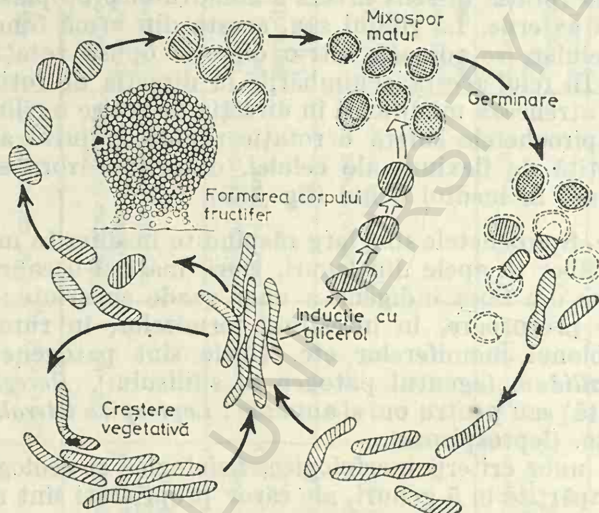


Fig. 157. — Ciclul de evoluție la *Myxococcus xanthus* (după Dworkin, 1973).

a) Pe mediile complexe cresc sub formă de celule vegetative dispersate, care se înmulțesc prin diviziune binară transversală (timpul de generație = 200 — 270 minute).

b) Pe mediile solide (lipsite de un anumit nutrient specific, în prezența unor produși finali ai căilor metabolice sau a unei mari densități de celule) au tendința de a se agrega în mase proeminente de grupuri de celule, din care se formează ulterior organe de fructificare sau *corpii fructificanți*, în care celulele vegetative își pierd motilitatea și evoluează spre starea de latență. S-a demonstrat că eliminarea triptofanului și a fenilalaninei dintr-un mediu nutritiv complet induce formarea corpilor fructificanți. Datorită acestui mecanism, cînd celulele roitoare percep că unii componenți specifici difuzibili sau constituenții unor macromolecule pe care le-au hidrolizat scad sub un anumit nivel încetează „roirea" spre exterior și se deplasează spre *centrii de agregare*.

Procesul de agregare a celulelor vegetative s-ar realiza sub influența unui stimul chemotactic, reprezentat fie de biosinteza *de novo* (în condițiile amintite) a unei substanțe cu rol de agregant (atractant), fie de sinteza unei sistem enzimatic, capabil să „recunoască" agregantul chemotactic sintetizat și prezent continuu în mediu.

Corpii fructificanți sînt structuri rudimentare multicelulare, macroscopice, cu formă, mărime și culoare caracteristice pentru fiecare specie, rezultate din agregarea unor celule nediferențiate care se transformă, prin morfogeneză și diferențiere, în *mixospori* sau *microchiști* (Dworkin, 1975). Apariția acestora poate fi indusă și prin adăugarea în mediu a unor substanțe chimice (glicerol 0,5 M, eritritol, izopropanol, etilenglicol etc.). Complexitatea structurilor fructificante mature variază de la simpli corpi, cu aspectul unor „picături" netede, colorate și strălucitoare, cu diametrul de 2 mm, proeminînd la suprafața mediului (alcătuiți din celule individuale în repaus, menținute împreună de o capsulă mucoasă), pînă la forme complicate, „sculptate", avînd un „cap" complex și un peduncul simplu sau ramificat. Ei pot conține peste 10^9 celule individuale.

Mixosporii sînt celule în general rotunde, în stare de latență refringente, capabile să germineze după transplantare în medii adecvate (de ex., *Myxococcus xanthus*). La unele specii, ei au forma unor sfere sau bacili mici, rezultați din scurtarea, îngroșarea și acoperirea cu un strat dens de mucus tare (capsula) și se numesc *microchiști*. Microchiștii sînt foarte refringenți, optic denși și au o rezistență mare la desicație (peste 10 ani).

La mixobacteriile superioare (*Chondromyces*, *Stigmatella*), organele de fructificare apar ca structuri mai complexe datorită faptului că celulele individuale sînt învelite într-un sac comun, formînd *macrochistul*, care după germinare eliberează celule vegetative, capabile să „roiască" pe suprafața mediului. Astfel, la *Chondromyces apiculatus*, organele de fructificare formează structuri arborescente, cu un trunchi principal (peduncul) și ramuri alcătuite din produși de secreție întăriți, la extremitățile cărora se găsesc chiștii mari, colorați strălucitor, închizînd sute sau mii de celule individuale cu un perete gros, mai mici decît celulele vegetative, dar cu aceeași structură. Datorită pedunculului, organele de fructificare sînt ridicate de la suprafața mediului. Studiul morfogenezei pedunculului a arătat că la început celulele agregate produc mucus la întîmplare, în mod neregulat. Acesta se usucă în părțile expuse contactului cu aerul și se întărește, creînd astfel o barieră pentru expansiunea sa ulterioară în sus sau lateral. Ca urmare, mucusul produs este excretat în jos, ridicînd masa de celule de pe suprafața mediului.

În condiții fizice și nutriționale favorabile mixosporii sau mixochiștii germinează dînd naștere unor celule active metabolic, de formă cilindrică care „roiesc".

Metabolism. Mixobacteriile sînt organisme chemoheterotrofe, strict aerobe, care fac hidroliza extracelulară a unor macromolecule insolubile (amidon, celuloză, peptidoglican, proteine etc.), folosind constituenții acestora pentru creștere. Se dezvoltă bine pe medii cu hidrolizat de proteine și săruri minerale.

Unele sînt *bacteriotrofe* și au proprietatea de a omorî și liza bacterii și alte microorganisme (mucegaiuri, drojdii, alge), înainte de a face hidroliza constituenților lor.

Ecologie. Mixobacteriile sînt răspîndite în sol, pe materialele vegetale pe cale de descompunere. Rolul lor în natură este corelat cu proprie-

tatea de a hidroliza macromoleculele insolubile. Unele specii (de ex., *Chondrococcus columnaris)* sînt patogene, producînd îmbolnăviri masive în păstrăvării.

Semnificație biologică. Mixobacteriile reprezintă grupul de organisme cu tipul de comportament și ciclul de viață cel mai complex dintre toate procariotele.

Deși celulele lor se comportă în esență independent unele de altele, ele prezintă, pe lîngă o mobilitate de tip puțin obișnuit, și un ciclu de viață care implică morfogeneză și diferențiere celulară și colonială, ca și unele fenomene de comunicare intercelulară. Acest comportament corespunde unui tip rudimentar de organizare „multicelulară" sau mai corect de *asociere comunitară*, reprezentînd, după Dworkin, cea mai simplă și mai primitivă „*comunitate organizată*". Asocierea caracterizează toate stadiile de viață: celulele se deplasează adesea în „roiuri" coordonate, care pulsează ritmic sau se mișcă coordonat.

Capacitatea lor de a face hidroliza extracelulară a unui număr mare de polimeri și de a-i utiliza în metabolism este în acord cu capacitatea de a se deplasa pe suprafața mediilor solide. Formarea unor concentrații optime de subunități cu greutate moleculară mică ale acestor polimeri depinde de o anumită densitate a celulelor care excretă hidrolaze (efect wolf-pack).

În felul acesta, ciclul lor de viață ar avea un caracter teleonomic, de reglare a densității celulare într-un anumit mediu, asigurînd în fiecare moment fie prezența, fie potențialul unei densități optime a celulelor vegetative (Dworkin, 1973).

Actinomicetele

(Pl. 99–103)

Actinomicetele formează un grup mare de bacterii filamentoase, tranzitoriu sau constant filamentoase și ramificate, obișnuit Gram-pozitive, caracterizate printr-o mare varietate de tipuri morfologice. Ca rezultat al creșterii și ramificării, multe actinomicete formează o rețea ramificată de filamente, numită miceliu. Datorită faptului că au unele asemănări izbitoare cu fungii (de exemplu, particularitatea de a forma hife cu ramificații adevărate și spori de diseminare) au fost considerate inițial, în mod eronat, ca făcînd parte din categoria acestor organisme.

Cele mai multe și mai importante particularități ale actinomicetelor le diferențiază însă de fungi și pledează pentru apartenența lor la lumea bacteriilor: 1) organizarea celulară a actinomicetelor este, ca și aceea a bacteriilor, de tip procariot: material genetic reprezentat de nucleoid, perete celular mureinic, deci lipsit de celuloză sau chitină, absența sterolilor din compoziția lor chimică, absența mitocondriilor și a reticulului endoplasmic, prezența flagelilor de tip procariot la speciile mobile etc.; 2) diametrul hifelor, structura și dimensiunile constituenților interni le diferențiază esențial de fungi; 3) prezintă unele forme strict anaerobe și forme cu nutriție de tip chimioautotrof, ceea ce nu se întîlnește nici-

odată la fungi; 4) sînt sensibile la acţiunea unor fagi de tip bacterian, actinofagi, şi la acţiunea antibioticelor care inhibă bacteriile Gram-pozitive şi rezistente faţă de aceea a antibioticelor strict antifungice (date noi arată că diferenţele de sensibilitate la antibiotice au semnificaţie filogenetică); 5) pentru natura lor bacteriană pledează, de asemenea, capacitatea de a face sinteza lizinei pe calea acidului diaminopimelic, precum şi particularităţile de tip procariot ale sistemelor de transfer şi de recombinare ale materialului genetic (Hopwood, 1972).

Toate actinomicetele, cu excepţia formelor celor mai simple, au o structură de colonie complexă, bazată pe micelii multinucleate, ramificate, cu diferenţiere în regiuni care joacă roluri vegetative şi reproductive (Charter şi Hopwood, 1973).

Morfologie. Unii membri ai ordinului *Actinomycetales* (de ex., *Mycobacterium* sp., *Actinomyces)* formează în mod obişnuit celule scurte, cu tendinţa de a forma rare filamente ramificate *(Mycobacterium)*. Cele mai multe actinomicete au însă o formă alungită, filamentoasă, cu o tendinţă marcată de ramificare, de unde aspectul lor de miceliu. Ramificarea se realizează ca şi la fungi după tipul monopodial (cel mai frecvent), dihotomic (ca la *Actinobifida)* sau verticilat (la *Streptoverticillium* — Kalakaoustii, 1976).

Filamentele miceliului, care au un ∅ de 0,5 – 2,0 μm (în general sub 1,0 μm) şi o lungime greu de definit, prezintă o structură de tip procariot, corespunzînd unor celule foarte lungi, multinucleate, fără pereţi transversali, în cursul creşterii vegetative. La unele specii, hifele au tendinţa să se fragmenteze şi de aceea pot fi văzute numai în anumite stadii de dezvoltare.

Cele mai multe actinomicete sînt saprofite în sol, atît la suprafaţă, cît şi în profunzimea lui. Ele sînt frecvente în solurile uscate, alcaline, arate şi, în genere, în orice sol bogat în substanţe organice; se dezvoltă şi pe resturi vegetale, pe plante, în bălegar (unele specii termofile), în apele lacurilor şi în nămol. Unele specii sînt parazite ale plantelor, omului şi animalelor.

Metabolism. O particularitate a fiziologiei actinomicetelor o constituie modul lor de nutriţie omnivor, care le permite să se dezvolte pe substraturi organice dintre cele mai diferite.

În condiţii naturale — pe resturi vegetale — actinomicetele încep să se dezvolte după ce bacteriile şi ciupercile au încetat să se mai multiplice, atunci cînd toate substanţele uşor asimilabile din resturile vegetale au fost descompuse şi asimilate de predecesorii lor.

Actinomicetele cresc bine şi pe mediile de cultură uzuale, neavînd nevoi speciale de substanţe nutritive şi de factori de creştere. Ele folosesc azotul în stare, atît minerală, cît şi organică, iar carbonul sub formă de acizi organici, dextrine şi amidon. Unele specii produc enzime extracelulare care permit utilizarea multor polizaharide, lipide, parafine, fenoli, lignină, taninuri sau cauciuc. Capacitatea lor de a degrada substanţele organice dintre cele mai complexe le conferă un rol important în natură, în special în descompunerea substanţelor organice din nămoluri şi din sol.

Pe medii de cultură artificiale, aceste microorganisme sintetizează diferite substanţe din grupul vitaminelor (B_1, B_2, B_{12}, biotină şi acizii

folic, pantotenic şi nicotinic), auxine, aminoacizi, precum şi diferiţi compuşi care dau culturilor un miros caracteristic de pămînt, de camfor sau de fructe. Ele sînt cel mai adesea strict aerobe, dar pot fi şi microaerofile sau facultativ anaerobe.

Actinosporii. Sporii actinomicetelor au fost mai puţin studiaţi. După Dworkin (1977), ei pot fi grupaţi în trei tipuri principale: 1) *sporangiospori*; 2) *endospori* şi 3) *spori hifali (artrospori)*, (fig. 158).

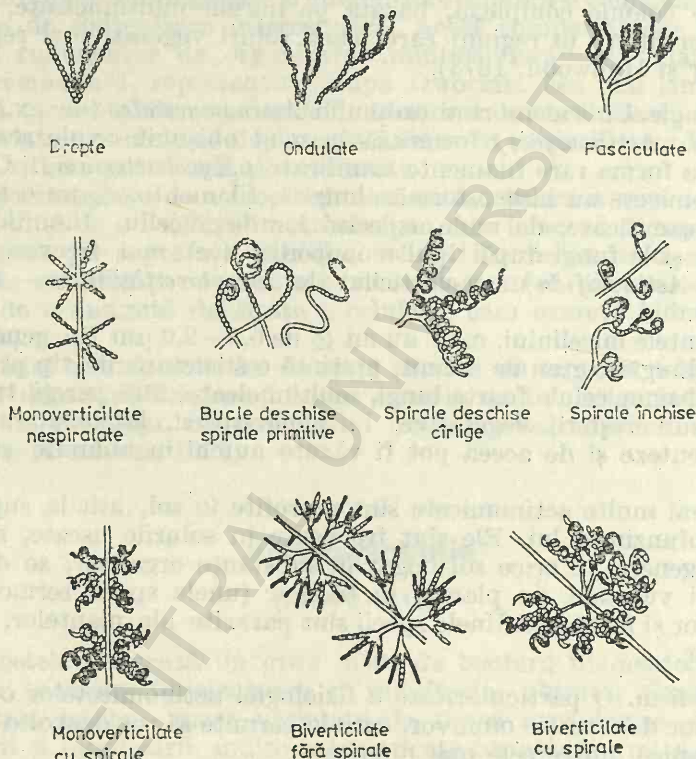


Fig. 158. — Morfologia diferitelor structuri purtătoare de spori la *Streptomycetes* (după Pridham, 1958).

Au fost descrise şi alte tipuri de spori, cu denumiri împrumutate în general din micologie: *chlamidospori*, *blastospori*, *microcişti* (Kalakaoustii, 1976) sau *oidiospori*, *aleuriospori*, *zoospori*, *aplanospori* (Cross, 1968, 1971).

Sporangiosporii au fost descrişi la *Actinoplanes*, care trăieşte în mediul acvatic, fixată frecvent pe frunzele submerse. Sporii se formează prin septarea sincronă şi diviziunea unui segment de hifă ramificată şi răsucită (spiralată) aflată într-o structură sferică — asemeni unui sac — sporangiul. În cursul procesului de eliberare din sporangiu, sporangiosporii devin mobili *(zoospori)*. Datorită unui smoc de flageli polari înoată

în jur, pentru ca ulterior să se stabilizeze, să piardă flagelii şi să producă un mic tub germinativ, care creşte şi se ramifică, formînd un miceliu.

Endosporii, foarte asemănători ca structură internă şi mod de formare cu cei descrişi la *Bacillus subtilis*, se formează în citoplasma hifei parentale şi sînt caracteristici bacteriei termofile *Thermoactinomyces vulgaris*. Caracteristica lor esenţială este legată de geometria regulată a suprafeţei pe care o au şi îi dau o formă poliedrică, cu 12 feţe pentagonale şi 12 feţe hexagonale, fiecare uşor concavă. Această geometrie este dependentă de suprafaţa învelişului extern sporal, alcătuit din şiruri paralele de lungi striaţii fibroase situate la intervale regulate şi dispuse în mai multe straturi, avînd fiecare o orientare diferită a fibrelor (Mc Vittie, 1972).

Sporii hifali (artrospori) sau *conidiospori* sînt produşi în lanţuri, prin septarea hifelor terminale *(sporofori)* ale miceliului aerian. După maturare, ei se detaşează foarte uşor de hifele sporogene. Sînt imobili şi uşor dispersaţi de hifele sporogene. Forma şi structura suprafeţei conidiosporilor (care pot fi evidenţiate numai pe microelectronografii) şi mai ales modelul de organizare a hifelor sporogene ale miceliului aerian reprezintă — datorită caracterului lor constant şi distinctiv — criterii utilizate în sistematică pentru împărţirea genului *Streptomyces* într-un număr de subgrupuri şi pentru identificarea acestora.

Genul *Streptomyces* cuprinde un număr mare de specii şi varietăţi şi este bine cunoscut, datorită numeroaselor substanţe antibiotice pe care le produce. Bacteriile din acest gen sînt foarte răspîndite în sol, iar unele se dezvoltă în apele dulci şi chiar în mări şi oceane. Ele dau mirosul caracteristic de pămînt al solului umed, datorită unor metaboliţi cunoscuţi sub denumirea generică de *geosmine* (compuşi ciclici nesaturaţi ai C, O şi H de tipul sesquiterpenoizilor, ca de ex.,trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol).

Ciclul de dezvoltare, studiat la *Streptomyces coelicolor*, este considerat ca reprezentativ pentru întregul gen (Chater şi Hopwood, 1973).

Depuse pe suprafaţa unui mediu de cultură solidificat cu agar, celulele reproductive *(conidiospori)*, cu formă sferică sau de mici bastonaşe, germinează producînd o mică excrescenţă hifală, care se ramifică imediat, în aşa fel încît, practic, de la un spor se formează 3—4 hife. Creşterea are loc la extremitatea hifelor şi se însoţeşte de ramificare frecventă, ducînd la formarea miceliului primar sau de substrat, format din numeroase filamente ramificate, legate strîns, compact, între ele. El formează în circa 48 de ore o colonie mică, cu $\varnothing \sim 1$ mm, lucioasă, compactă şi densă. Ulterior, în numeroase regiuni ale micelului se dezvoltă numeroase hife iniţial mai laxe, pe suprafaţa mediului, care cresc pentru a forma un miceliu secundar sau aerian, cu aspect pulverulent, cel mai adesea diferit la culoare de miceliul de substrat subiacent. Colonia, iniţial albă şi acoperită de numeroase filamente, devine, cînd este complet dezvoltată, cenuşie, în special datorită sporilor maturi (Wildermuth, 1970).

În coloniile care sporulează abundent, miceliul aerian este foarte eterogen: suprafaţa coloniei este formată din spori maturi, lanţuri de spori şi celule hifale intacte, în timp ce zonele situate la distanţă de marginile coloniei, atît deasupra, cît şi sub suprafaţa mediului, conţin celule hifale dezintegrate. Frecvent, imediat sub suprafaţa coloniei, se

văd mulți spori germinați, indicînd apariția unor cicluri secundare de creștere (fig. 159).

În afară de poziția sa în raport cu suprafața mediului de cultură, miceliul aerian se deosebește prin mai multe particularități de miceliul de substrat (Higgins și Silvey, 1966):

Este ceva mai gros decît miceliul de substrat. Conține în mod obișnuit un pigment de culoare închisă, insolubil, asociat cu învelișul extern,

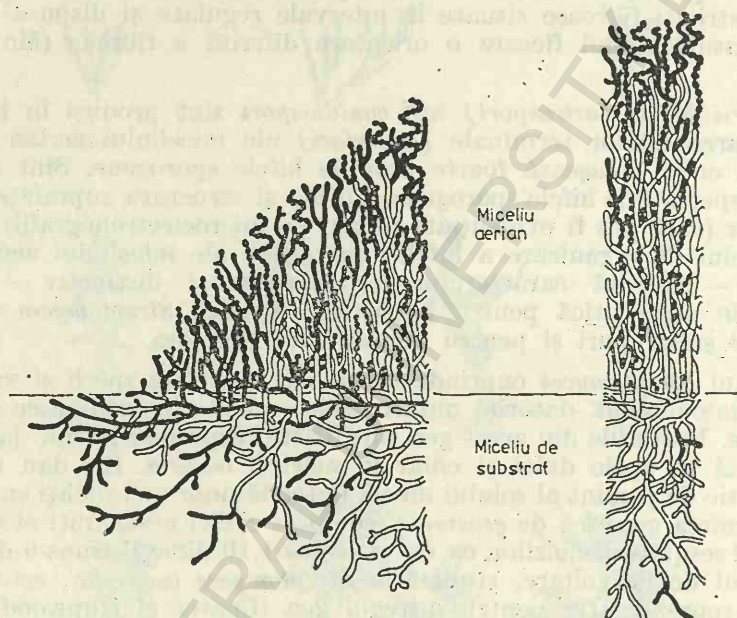


Fig. 159. — Reprezentarea schematică a unei secțiuni verticale prin centrul unei colonii de *Streptomyces coelicolor* în momentul maxim al sporulării. Celulele intacte sînt reprezentate în negru, iar cele în curs de dezintegrare sau complet lizate în alb (după Wildermuth, 1970).

care apare cenușiu dacă este examinat în lumină reflectată. Are o mai slabă tendință de ramificare și este aproape complet lipsit de tendința de a pătrunde în mediu. Este hidrofob și obligat anaerob, spre deosebire de miceliul de substrat care este facultativ anaerob. Suprafața externă a hifelor aeriene, ca și aceea a sporilor este acoperită de o teacă fibroasă superficială, care este absentă în miceliul de substrat. Teaca are o structură caracteristică, fiind formată din perechi de bastonașe mici așezate aparent pe o membrană fină, în așa fel încît, în ansamblu, formează un desen similar cu împletitura unui coș de nuiele.

Miceliul aerian reprezintă un caz unic de celulă procariotă vegetativă, care este menținută în stare funcțională în absența apei în mediul imediat înconjurător. Probabil că această comportare este favorizată de anumite bariere (cum ar fi structura specifică a tecii de suprafață), care protejează citoplasma hifelor aeriene de desicația rapidă.

Sporogeneza la Streptomyces este diferită de cea descrisă la *Bacillus* şi evoluează în patru stadii succesive (Wildermuth şi Hopwood, 1970):

1) Celulele lungi cenocitice ale miceliului aerian devin spiralate, iar viitorul sporofor este separat de un sept unic de hifa corespunzătoare, determinînd formarea de celule cu mărimi aproximativ egale, care se vor transforma în spori.

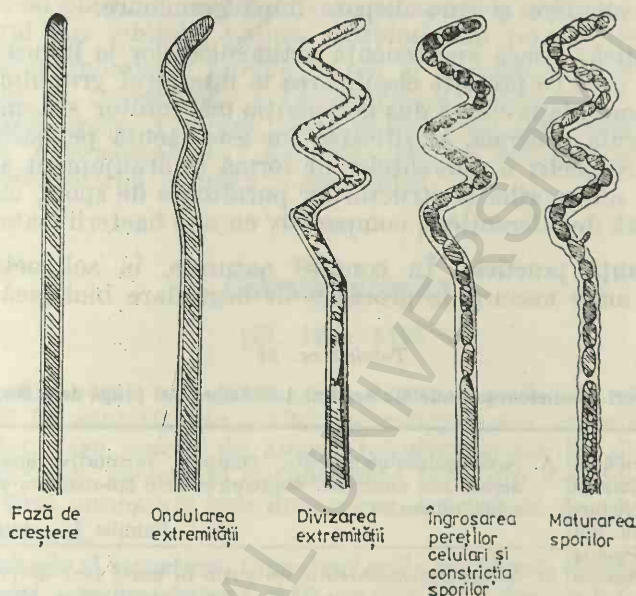


Fig. 160. — Reprezentarea schematică a etapelor de conversie a hifelor aeriene de *Streptomyces* în spori (conidii) (după Wildermuth şi Hopwood, 1970).

2) În faza următoare, în hifa sporogenă are loc apariţia simultană (sincronă) a septurilor de sporulare (frecvent asociate cu prezenţa mezosomilor), la intervale regulate de 1,0 — 2,0 μm. Septurile se formează prin creşterea spre interior a unui inel dublu, ca o diafragmă, în continuitate cu structura peretelui celular şi a membranei citoplasmatice. Procesul este diferit de septarea hifelor de substrat şi a celor aeriene în cursul creşterii vegetative.

3) Cînd sporularea este completă, începe depunerea peretelui gros sporal.

4) Sporii, iniţial cilindrici, devin elipsoidali. Resturile de perete celular vechi, micelian, se dezintegrează. La sfîrşitul procesului de maturare sporii elipsoidali dispuşi în lanţuri sînt legaţi numai printr-o unică interfaţă şi prin resturi din teaca fibroasă (fig. 160).

Sporii de *Streptomyces* nu conţin acid dipicolinic şi nu sînt foarte rezistenţi la căldură. Sînt capabili de supravieţuire îndelungată şi de rezistenţă la desicaţie şi la toxice chimice. Ei nu sînt endospori, ci compartimente relativ nespecializate ale hifelor aeriene.

Suprafaţa lor este netedă, dar la unele specii poate prezenta o serie de proeminenţe sub formă de spini, fire de păr sau mici butoni.

Structura internă a sporului de *Streptomyces* este similară cu a celulei vegetative a hifelor aeriene, cu excepţia peretelui sporal care este de ~ 2 ori mai gros decît al celulei vegetative. El nu conţine însă structuri caracteristice cum sînt cortexul, învelişul sporal sau exosporul. Peretele sporal conţine un pigment care dă culoarea caracteristică a miceliului aerian şi a coloniilor şi care dispare după germinare.

Sistematică. Dacă apartenenţa actinomicetelor la lumea bacteriană este certă, în ceea ce priveşte clasificarea în interiorul grupului nu există un acord unanim, fapt care a dus la apariţia mai multor sisteme de clasificare. Ca regulă generală, clasificarea lor este făcută pe baza criteriilor morfologice, respectiv a diferenţelor de formă şi aranjament ale filamentelor aeriene, ale sporilor şi structurilor purtătoare de spori, care reflectă o gamă variată de diferenţiere, comparativ cu alte bacterii (tabelul nr. 22).

Importanţă practică. În condiţii naturale, în sol, actinomicetele participă, în mare măsură, la procesele de degradare biologică şi minera-

Tabelul nr. 22

Principalele grupuri de microorganisme din ordinul *Actinomycetales* (după date din Bergey, 1974)

I. Celulă în formă de bastonaş, difteroid sau cocoide. Nu formează miceliu. Pot produce filamente ramificate. Absenţa sporilor.	A. Neacidoalcoolorezistente. Obişnuit facultativ anaerobe. Unele aerobe sau anaerobe. Multe nu au acid 2,6-diamino pimelic în peretele celular. Familia I — *Actinomycetaceae*	
	B. Acidoalcoolorezistente, cel puţin în unele faze de creştere. Familia II — *Mycobacteriaceae*	
II. Produc miceliu adevărat	A. Simbionţi în noduli pe rădăcinile plantelor. Au un stadiu liber în sol. Fixatori de azot molecular. Familia III — *Frankiaceae*	
	B. Saprofite sau facultativ parazite	1. Spori formaţi în sporangiu. Familia IV — *Actinoplanaceae*
		2. Spori independenţi de sporangiu a) Familia V — *Dermatophilaceae*. Filamente miceliene care se divid transversal în cel puţin două planuri longitudinale pentru a forma mase de elemente cocoide mobile. Absenţa miceliului aerian. b) Familia VI — *Nocardiaceae*. Filamente miceliene care se fragmentează de regulă pentru a produce elemente cocoide sau alungite, obişnuit imobile. Spori aerieni, dar obişnuit absenţi. Uneori acidorezistente. c) Familia VII — *Streptomycetaceae*. Filamente cu tendinţa de a rămîne intacte, fără a se fragmenta. Obişnuit, miceliu aerian abundent şi lungi lanţuri de spori (5 — > 50). d) Familia VIII — *Micromonosporaceae*. Filamentele miceliene rămîn intacte. Sporii se formează izolat, în perechi sau în lanţuri scurte, fie pe unul, fie pe ambele micelii (aerian şi de substrat).

lizare a substanţelor organice. Importanţa lor practică este legată de faptul că reprezintă, în general, prin specii ale genului *Streptomyces*, cei mai activi producători de substanţe antibiotice (peste 500 de antibiotice distincte separate pînă în prezent); aproximativ 50 % din tulpinile izolate din natură produc substanţe antibiotice. Unele specii produc mai multe tipuri, deseori neînrudite chimic, tot aşa după cum acelaşi antibiotic poate fi produs de specii izolate din regiuni foarte îndepărtate ale lumii. În mod obişnuit, modificările în compoziţia mediului şi în nutriţia organismului pot schimba natura antibioticului produs (Stanier, 1974).

Unele actinomicete produc la om şi la animale infecţii cu localizări variate ca tuberculoza *(Mycobacterium tuberculosis)*, infecţii viscerale *(Actinomyces*, *Nocardia*, *Streptomyces* etc.) sau afecţiuni cutanate superficiale *(Dermatophilus*, *Micromonospora)*. *Str. scabies* este fitopatogen şi produce rîia comună a cartofului.

Cianobacteriile

(Pl. 104–112)

Cianobacteriile — cel mai mare, mai divers şi mai larg răspîndit grup de bacterii fotosintetizante — sînt microorganisme cu o organizare de tip procariot, care posedă un aparat fotosintetic similar din punctul de vedere molecular, structural şi funcţional celui din cloroplastul celulelor eucariote. Sînt cunoscute sub denumirea, intrată în uz, de *alge albastre* sau *albastre-verzi*.

Morfologie şi structură. Cianobacteriile au formă sferică sau bacilară şi dimensiuni cuprinse între 1 şi 10 µm (fig. 161). Apar sub formă de celule izolate, asociaţii coloniale sau filamente; formele filamentoase sînt cele mai complexe, deoarece pot prezenta două tipuri adiţionale de celule — *akineţii* şi *heterociştii* — rezultate prin diferenţierea celulelor vegetative.

Genomul cianobacteriilor este reprezentat de o moleculă de ADN dublu helicală circulară, avînd, în funcţie de specie, dimensiuni variabile (g.m. 1,6 — 7,6 $\times 10^9$ dal).

Peretele celular are o structură moleculară şi anatomică tipică pentru bacteriile Gram-negative şi este frecvent acoperit de o teacă gelatinoasă, polizaharidică sau fibroasă, care în unele cazuri înconjură mai multe celule individuale. Foarte frecvent, teaca gelatinoasă conţine inclavate numeroase bacterii provenite din mediul înconjurător. Îndepărtarea lor şi obţinerea de culturi pure de cianobacterii este uneori extrem de dificilă.

Cea mai mare parte din protoplast este ocupată de componenţii aparatului fotosintetic, care de regulă este localizat într-o serie de saci membranoşi turtiţi — *tilacoizii* — care sînt sediul pigmenţilor lipofili (clorofila *a* şi carotenoizii), ai centrilor de reacţie fotochimică şi ai lanţului transportor de electroni. Tilacoizii prezintă mai multe tipuri de aranjament, dintre care cel mai simplu, descris la *Synechococcus* şi *Pseudoanabaena*, are forma unui şir cortical de 2—5 tilacoizi, aranjaţi paralel unul faţă de altul şi faţă de axul lung al celulei. În majoritatea cazurilor însă,

tilacoizii au aspectul unor membrane convolute, topologic distincte de membrana plasmatică sau prezentînd conexiuni cu ea. Singura excepţie faţă de acest tip de organizare o constituie *Gloeobacter violaceus* la care, în absenţa tilacoizilor, sistemul fotosintetic este localizat în membrana plasmatică lipsită de intruziuni.

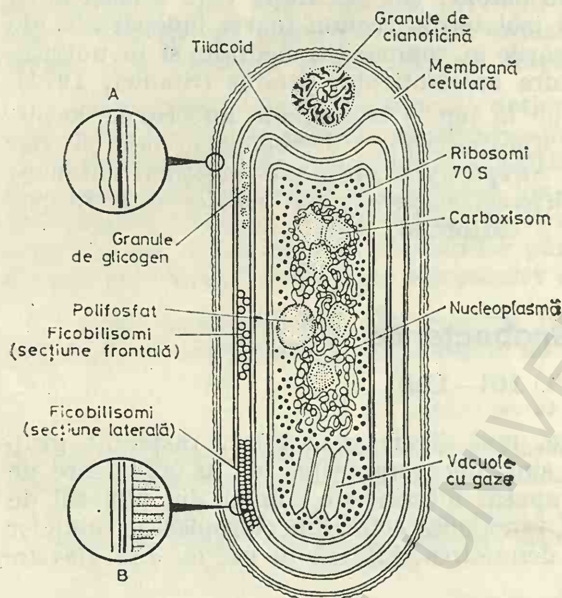


Fig. 161. — Secţiune printr-o celulă vegetativă de cianobacterie (model general), evidenţiind principalii constituenţi structurali. A. Porţiune mărită din peretele celular, evidenţiind membrana externă, stratul peptidoglicanic şi membrana plasmatică. B. Porţiune dintr-un tilacoid, mărită pentru a evidenţia structura membranelor şi ficobilisomii ataşaţi, reprezentaţi numai pe una din feţele tilacoizilor (după Stanier, 1977).

Foarte caracteristică pentru cianobacterii este localizarea extracelulară (ca şi la *Rhodophyta)* a ficobiliproteinelor, pigmenţii majori de captare a luminii. Ei sînt localizaţi în *ficobilisomi*, ataşaţi în şiruri regulate pe suprafaţa externă a tilacoizilor, în aşa fel încît tilacoizii adiacenţi sînt separaţi unul de altul printr-un spaţiu de 50 nm, ocupat de şiruri contigue de ficobilisomi.

Ficobilisomii (Gant şi Conti, 1962) sînt agregate macromoleculare de biliproteine, sub formă de granulaţii cu ∅ 35—50 nm, care pot reprezenta pînă la 5 % din proteina totală celulară. Ficobiliproteinele sînt cromoproteine care se deosebesc după lungimea de undă (λ) a luminii pe care o absorb. Ele sînt reprezentate, în principal, de *ficocianină* (PC λ max 620 μm), *aloficocianină* (AP λ max 650 μm), *aloficocianină B* (APB λ max 670 μm) şi accesoriu de *ficoeritrină* şi *ficoeritrocianină* (PE şi PEC λ max 565 μm); cantitatea lor relativă este totdeauna în ordinea : PC $>$ AP $\gg$ APB.

Celulele vegetative ale cianobacteriilor conţin în mod constant granule de polifosfat, granule de glicogen („α granule"), *granule de cianoficină* („granule structurate") şi *carboxisomi* („corpi poliedrici"). Unele specii conţin incluziuni de poli-β-hidroxibutirat şi vezicule cu gaze.

Granulele de cianoficină sînt caracteristice cianobacteriilor, nefiind găsite pînă în prezent la nici un alt grup de organisme. Apar sub forma unor granule refringente mari, vizibile la microscopul fotonic, cu formă

neregulat-sferoidală şi ∅ de 0,5 — 1,0 μm, care se acumulează în celulele vegetative în faza staţionară de creştere şi în akineţi. Sînt alcătuite din lanţuri polipeptidice mari, ramificate, formate numai din doi aminoacizi: acidul aspartic, dispus în aşa fel încît formează un polimer linear „sîmbure'' ce poartă resturi laterale de arginină.

Sinteza cianoficinei (multi-L-arginil-poli-L-acid aspartic) nu este controlată genetic pe ribosomi, ci se realizează sub acţiunea unei enzime multi-L-arginil-poli-(L-acid aspartic)-sintetaza, care încorporează într-un polimer arginina şi acidul aspartic prezenţi în citoplasmă. După Shively (1974), în cursul creşterii normale cei doi aminoacizi sînt încorporaţi în structura proteinelor. După încetarea creşterii, cînd sinteza proteinelor este oprită, ei sînt depozitaţi în polimeri de rezervă (cianoficină).

Heterochiştii sînt celule derivate din diferenţierea celulelor vegetative, prin modificări profunde de ultrastructură, biochimice şi fiziologice. Sînt caracteristici anumitor cianobacterii filamentoase, la care pot fi localizaţi terminal şi/sau intercalar. La microscopul fotonic pot fi deosebiţi de celulele vegetative prin învelişul extern mult mai gros, aspectul de celule goale, incolore sau gălbui, şi prezenţa unor granulaţii refringente la locul de joncţiune cu celulele vegetative adiacente (fig. 162).

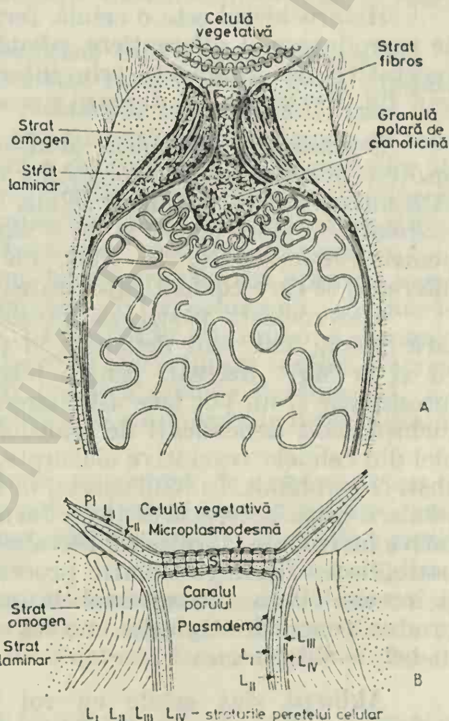


Fig. 162. — Reprezentarea schematică, în secţiune, a unui heterochist conectat cu celula vegetativă. Jos: detaliu de structură al regiunii septului despărţitor (S) de celula vegetativă (după Lang şi Fay, 1971).

Pe microelectronografii, învelişul extern, gros, tristratificat, apare format dintr-un strat extern fibros, un strat median omogen (electrondens) şi un strat intern cu structură laminară. Regiunile polare ale heterochiştilor — la început rotunde — aflate în contact cu celulele vegetative învecinate, se modifică progresiv pentru a forma o suprafaţă structural specializată de contact. La nivelul acestei suprafeţe, stratul median şi cel intern sînt mult îngroşate (hipertrofiate) în aşa fel încît formează un „gît'' tubular, iar contactul cu celulele vegetative învecinate este redus la o suprafaţă mică, turtită („porul septal''). La rîndul său, porul septului este traversat de o serie de conexiuni intercelulare fine numite *microplasmodesme* (Lang şi Fay, 1971), care leagă heterochistul de celulele vegetative vecine. La heterochiştii bătrîni, porii sînt astupaţi de un dop osmofil — *granula polară*, vizibilă şi la microscopul fotonic — alcătuit

dintr-un copolimer de acid aspartic şi arginină, care conţine probabil şi cianoficină.

În cursul diferenţierii heterochiştilor se formează prin biosinteză (şi nu prin rearanjarea tilacoizilor, cum s-a crezut iniţial) un bogat sistem de membrane, sub forma unei spirale concentrice situată în zona centrală, conectat cu o serie de membrane contorte, caracteristice, care formează o zonă ca un fagure de albine (Lang, 1965) sub fiecare pol.

Heterochistul este o celulă terminală, care şi-a pierdut capacitatea de reproducere şi diferenţiere, aflată în contact strîns, direct, cu celulele vegetative din filament, prin intermediul unui canal îngust şi al unui sept fin. Formarea lui durează aproximativ 24 de ore.

Semnificaţie biologică. Modificările structurale şi biochimice care însoţesc dezvoltarea heterochiştilor se desfăşoară paralel cu apariţia activităţii nitrogenazice şi conferă celulei capacitatea de a menţine acest sistem enzimatic în stare activă şi de a satisface marea nevoie de ATP, utilizat pentru reducerea N_2 la NH_3. Ca urmare, heterochiştii sînt structuri diferenţiate care conferă capacitatea de fixare a azotului molecular.

Heterochiştii păstrează fotosistemul I şi, ca urmare, fac fotofosforilare ciclică, dar sînt deficitari în fotosistemul II care captează lumina, cît şi în Mg^{2+} necesari pentru fotoliza apei. Ca urmare, nu produc O_2 fotosintetic şi nu pot face asimilarea fotosintetică a CO_2. De aceea, heterochiştii sînt dependenţi de transferul intracelular al metaboliţilor organici din celulele vegetative alăturate, care, la rîndul lor, obţin din heterochşti N combinat. În felul acesta, în filament se realizează o simbioză intercelulară între heterochişti (care furnizează compuşi cu N) şi celulele vegetative învecinate (furnizează metaboliţi organici şi probabil ATP). Incompatibilitatea fiziologică dintre procesul de fixare a N_2 (inactivarea rapidă şi ireversibilă a nitrogenazei la presiuni scăzute de O_2) şi fotosinteza producătoare de O_2 este evitată prin separarea celor două procese în celule diferite.

Akineţii sînt celule cu rol în supravieţuire, prezente numai la cianobacteriile cu heterochişti. Se formează cel mai frecvent din celule vegetative adiacente heterochiştilor, prin modificarea formei şi mărirea considerabilă a celulei, însoţite de depunerea de straturi dense fibrilare pe suprafaţa celulei şi acumulare de material granular.

Studiaţi în special la *Anabaena cilindrica*, akineţii au o formă sferică sau cilindrică şi sînt acoperiţi de un înveliş celular gros, multistratificat, adesea pigmentat, aşezat în jurul învelişurilor celulare normale. Prezintă o structură granulară datorită prezenţei de cianoficină, iar tilacoizii au forme contorsionate. Akineţii sînt unicelulari la maturare, dar în momentul germinării suferă o serie de diviziuni transversale rapide, în aşa fel încît, deseori, eliberează un scurt lanţ de celule mai mari decît celulele vegetative.

Prezintă rezistenţă mai mare la temperaturi ridicate decît celulele vegetative, fapt care permite menţinerea lor în stare latentă vreme îndelungată.

Metabolism. Cianobacteriile sînt microorganisme fotoautotrofe aerobe. Ele folosesc energia obţinută prin reacţii de fotosinteză producătoare de

oxigen, pentru a face biosinteza constituenţilor celulari pornind de la substanţe anorganice. Unele specii sînt facultativ chemoheterotrofe şi se pot dezvolta mult mai lent la întuneric, utilizînd o gamă limitată de zaharuri.

Creşterea prelungită la întuneric nu determină pierderea funcţiei fotosintetice: capacitatea de sinteză a clorofilei şi a ficobiliproteinelor este menţinută, iar transferul la lumină, în medii de cultură cu substanţe minerale, este urmat de reluarea creşterii fotoautotrofe după o scurtă perioadă de lag.

Sistemul lor de pigmenţi fotosintetici este distinct şi conţine, pe lîngă clorofila *a*, şi β-caroten (caracteristic tuturor fototrofelor producătoare de O_2), carotenoizi specifici *(echinonă, mixoantofilă)*, care apar rar la alte organisme fototrofe, ca şi proteine colorate, conjugate cu tetrapiroli lineari, ***ficobiliproteine***. În funcţie de combinaţiile pigmenţilor din această clasă în celule, culoarea cianobacteriilor poate varia mult. Speciile care conţin numai ficocianină sînt albastre-verzi. Prezenţa ficoeritrinei (roşie), ca înlocuitor sau adăugată ficocianinei, modifică culoarea în funcţie de concentraţie, de la roşu la brun, brun-purpuriu sau aproape negru.

Cianobacteriile formează diviziunea I *Cyanobacteria* (Stanier) a regnului *Procaryotae* (Bergey, 1974). „Utilizarea în continuare a denumirilor de alge albastre-verzi sau de cianofite perpetuiază o falsă impresie asupra naturii lor biologice. Această practică trebuie descurajată, deşi unii algologi par să accepte cu greutate o schimbare de nume (Stanier şi Cohen-Bazire, 1979).

Studiul comparativ al unui număr important de tulpini, bazat pe criterii diferenţiale constante şi uşor determinabile în culturi pure, utilizate în bacteriologie, a permis gruparea cianobacteriilor în 22 de genuri*), grupate în 5 secţiuni (tabelul nr. 23).

S e c ţ i u n e a I grupează cianobacterii unicelulare cu formă sferică, cilindrică sau ovalară. Ele sînt cele mai simple structural şi au echivalenţi în celelalte grupe majore de bacterii Gram-negative (tabelul nr. 24).

Cianobacteriile grupate în s e c ţ i u n e a II au celula vegetativă acoperită totdeauna de un strat fibros adiţional, care aderă strîns de stratul membranei externe şi sînt caracterizate printr-un tip special de reproducere — diviziunea multiplă — care nu a mai fost descris la nici un grup de procariote.

Diviziunea multiplă este rezultatul unor diviziuni simple (binare) rapide ale celulei vegetative în interiorul stratului fibros parietal, neînsoţită de creştere. Acest proces duce la apariţia unor celule reproducătoare mici, sferice, care sînt ulterior eliberate prin ruperea stratului fibros al peretelui celular parental. În nomenclatura algologică acest tip de celulă este numit endospor, dar pentru a evita confuziile posibile pentru lumea procariotelor, Waterbury şi Stanier (1978) au propus denumirea de „baecocyte" (gr. = celulă mică). Numărul de beocite produs de o celulă parentală poate varia între 4 şi peste 1 000.

---

*) Clasificarea cianobacteriilor pe baza criteriilor Codului Botanic (Stafleu, 1972) cuprinde aprox. 150 de genuri şi peste 1 000 de specii, dintre care foarte multe cad în categoriile *nomina dubia, nomina confusa* sau *nomina perplexa*.

La cei mai mulţi reprezentanţi ai secţiunii II, în momentul eliberării lor, peretele beocitelor este format numai din peptidoglican şi stratul membranei externe şi, ca urmare, prezintă mobilitate prin alunecare. Ele devin însă imobile pe măsură ce îşi măresc dimensiunile şi încep sinteza stra-

Tabelul nr. 23

Subgrupe majore de cianobacterii (Rippka, Stanier şi colab., 1979)

Unicelulare; celule izolate sau care formează agregate coloniale menţinute de straturi externe adiţionale ale peretelui celular	Reproducere prin diviziune simplă sau prin înmugurire			*Secţiunea I*
	Reproducere prin diviziune multiplă, care produce celule-fiice mici (*beocite*) sau, deopotrivă, diviziune multiplă şi simplă			*Secţiunea II*
Filamentoase; un trihom care creşte prin diviziune celulară intercalară	Reproducere prin ruperea la întîmplare a trihomului, prin formare de *hormogonii**) (numai secţiunile IV şi V), uneori prin germinarea akineţilor	Trihom compus totdeauna numai din celule vegetative	Diviziune numai într-un singur plan	*Secţiunea III*
		În absenţa azotului combinat, trihomul conţine heterochişti; unele produc şi akineţi	Diviziune numai într-un singur plan	*Secţiunea IV*
			Diviziune în mai multe planuri	*Secţiunea V*

Tabelul nr. 24

Particularităţile cianobacteriilor din secţiunea I (după Rippka, Stanier şi colab., 1979)

		Diviziune într-un singur plan	Diviziune în două sau trei planuri
Reproducere prin diviziune simplă	Absenţa tilacoizilor	Teaca prezentă *Gloeobacter*	—
	Prezenţa tilacoizilor	Teaca prezentă *Gloeothece*	Teaca prezentă *Gloeocapsa*
		Teaca absentă *Synechococcus*	Teaca absentă *Synechocystis*
Reproducere prin înmugurire	Prezenţa tilacoizilor	*Chamaesiphon*	—

*) *Hormogonia* — denumire folosită frecvent cu un sens echivoc — corespunde unui lanţ scurt de celule, care se deosebeşte de trihomul vegetativ din care provine prin mobilitate sau prin diferenţe de mărime şi/sau structură ale celulelor constitutive. Din dezvoltarea sa rezultă un trihom primar, iniţial neramificat şi uniseriat.

turilor fibroase ale peretelui celular. În alte cazuri însă, sinteza straturilor parietale fibroase are loc paralel cu diviziunea multiplă și, ca urmare, beocitele au strat fibros în momentul eliberării lor în mediu, fiind totdeauna imobile.

Cianobacteriile din genurile *Dermocarpa* și *Xenococcus* se înmulțesc numai prin diviziune simplă, în timp ce la *Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Chroococcidiopsis* și grupul *Pleurocapsa*, mărirea beocitului este urmată de o serie de diviziuni simple, care duc la formarea unui agregat de celule vegetative, aderente unele de altele. Ulterior, unele celule din agregat sau chiar toate suferă diviziuni multiple și eliberează beocite (tabelul nr. 25).

Tabelul nr. 25

Particularitățile cianobacteriilor din secțiunea II (după Rippka, 1979)

○ Beocite fără stratul parietal extern fibros
● Beocite cu stratul parietal extern fibros

Reproducere numai prin diviziune multiplă	Beocite mobile ○ Beocite imobile ●	*Dermocarpa* *Xenococcus*
Reproducere prin diviziune simplă și diviziune multiplă	Diviziunea simplă duce la structuri în formă de pară compuse din 1 sau 2 celule bazale și o celulă apicală; diviziunea multiplă ulterioară a celulei apicale produce beocite mobile ○	*Dermocarpella*
	Diviziunea simplă produce agregate cubice; diviziunea multiplă ulterioară produce: beocite mobile ○ beocite imobile ●	 *Myxosarcina* *Chroococcidiopsis*
	Diviziunea simplă produce agregate celulare neregulate (pseudofilamente); diviziunea multiplă ulterioară produce beocite mobile ○	grupul *Pleurocapsa*

Unitatea de structură a cianobacteriilor din secțiunile III—V este trihomul, deseori inclus într-o teacă tubulară, a cărui creștere este asigurată de creșterea numărului de celule rezultate din diviziuni celulare repetate intercalare. Formarea septului transversal de diviziune este rezultatul creșterii centripete a stratului peptidoglicanic, urmată de aceea a stratului membranei externe. Gradul în care acesta din urmă participă la formarea pereților transversali este reflectat în gradul de constricție aparent între celulele care formează trihomul.

Reproducerea se realizează prin ruperea trihomului matur în lanțuri mai scurte de filamente reproductive, care de multe ori se deosebesc de trihomul matur prin mobilitatea lor prin alunecare. Fragmentele mobile de trihom acoperite de teacă, sînt cunoscute în literatura algologică sub denumirea de *hormogonium*. Raportat la cianobacteriile cu heterochiști, acest termen poate fi extins la toate tipurile de filamente, mobile sau imobile, care se deosebesc de trihomul parental prin mărimea și forma celulei, vacuolele cu gaz sau absența heterochiștilor, chiar cînd cresc pe un mediu lipsit de o sursă de N combinat.

În cazurile în care ruperea trihomului are loc în interiorul tecii, creşterea lui ulterioară poate produce ieşirea în afară a unuia sau mai multor filamente-fiice, prin teaca peretelui, eventual într-o aşezare unghiulară.

Această configuraţie, evidentă deseori la bacteriile cu teacă, grupate în secţiunile III—V, este denumită „falsă ramificare" pentru a o deosebi de ramificarea adevărată — dihotomică — caracteristică celor mai multe cianobacterii din secţiunea V.

La cianobacteriile din s e c ţ i u n e a III, trihomul este alcătuit numai din celule vegetative şi este totdeauna uniseriat, ca rezultat al faptului că diviziunile celulare succesive apar regulat într-un plan situat în unghi drept faţă de axul lung al trihomului (tabelul nr. 26, fig. 163).

Tabelul nr. 26

Cianobacteriile din secţiunea III (după Rippka, Stanier şi colab., 1979)

Trihom helical	Celulele care formează trihomul sînt izodiametrice, cilindrice sau în formă de disc; constricţie slabă sau absentă între celulele adiacente; reproducere prin ruperea transcelulară a trihomului	Trihom mobil, lipsit de teacă, sau cu o teacă subţire *Spirulina*
Trihom linear drept	Celulele care formează trihomul au formă de disc şi nu sînt separate prin constricţii profunde; reproducere prin ruperea transcelulară a trihomului	Trihom mobil, fără teacă, sau cu o teacă subţire *Oscillatoria*
		Trihom imobil, închis într-o teacă groasă; mobilitatea prezentă numai la hormogoniile lipite de teacă sau cu o teacă subţire grupul A LPP*)
	Celulele care formează trihomul sînt izodiametrice sau cilindrice; cu grade variabile de constricţie între celulele adiacente; reproducere prin ruperea transcelulară sau intercelulară a trihomului	Trihom mobil, lipsit de teacă; celulele conţin vacuole cu gaze, polare şi sînt separate prin constricţii profunde. *Pseudoanabaena*
		Diferit de cele de mai sus; cu sau fără teacă, mobile sau imobile. grupul B LPP*)

*) LPP = Lyngbia, Phormidium, Plectonema

Cianobacteriile filamentoase din s e c ţ i u n i l e IV şi V se deosebesc de cele din secţiunea III prin capacitatea lor de diferenţiere celulară.

În absenţa unei surse de N combinat, o mică parte din celulele trihomului formează heterochişti care se deosebesc de celulele vegetative prin peretele lor celular gros, relativ slaba pigmentare şi prezenţa de granule polare refringente, incapabili de diviziune sau de diferenţiere după ce au devenit maturi. Heterochiştii reprezintă sediul celular specific al fixării N_2 în condiţii aerobe. Granulaţiile polare formează punctele de legare ale

heterochiştilor de celulele vegetative adiacente. Datorită acestui rol, un heterochist intercalat are cîte o granulaţie la fiecare pol, în timp ce unul terminal are o singură granulaţie, la polul în contact cu celula vegetativă.

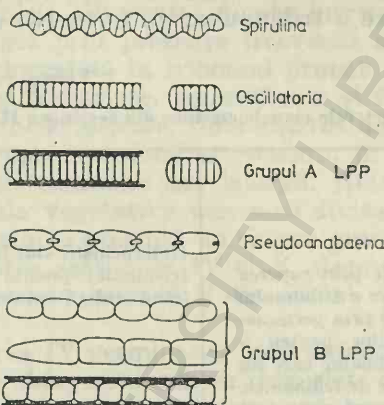


Fig. 163. — Reprezentarea schematică a genurilor din secţiunea III. Liniile care înconjură trihoamele corespund substanţelor care formează materialul tecilor de înveliş. Corpii polari *(Pseudoanabaena)* reprezintă vacuole polare cu gaze (după Rippka şi Stanier, 1979).

Unele cianobacterii din secţiunile IV şi V pot produce celule de repaus cu perete celular gros — akineţi — care apar cînd culturile se apropie de faza staţionară. De regulă, independent de natura sursei de N, deosebirea fundamentală dintre membrii secţiunilor IV şi V este reprezentată de polaritatea diviziunilor celulare succesive, în cursul creşterii trihomului.

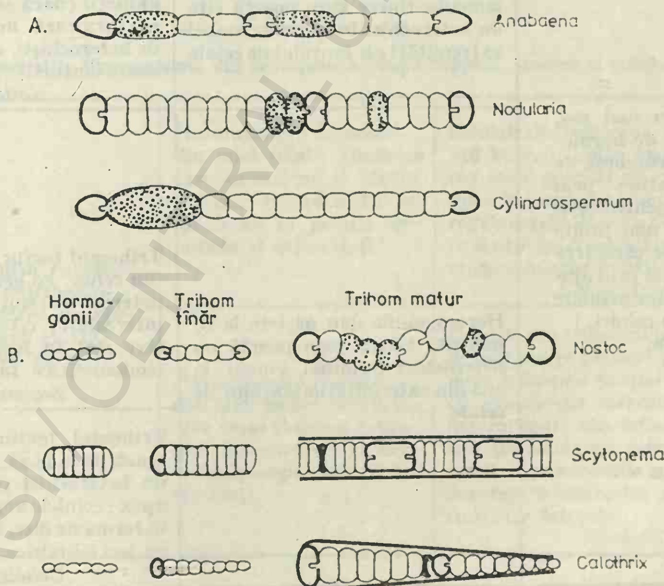


Fig. 164. — Reprezentarea schematică a genurilor din secţiunea IV. **A.** Fără ciclu de dezvoltare. **B.** Cu ciclu de dezvoltare. Celulele cu pereţi groşi şi granule polare sînt heterochişti, iar cele cu pereţi groşi şi conţinut punctat sînt akineţi. Liniile din jurul trihoamelor corespund tecilor (după Rippka şi Stanier, 1979).

În cadrul s e c ţ i u n i i IV (fig. 164, tabelul nr. 27), diviziunile celulare intercalate se produc totdeauna într-un singur plan, situat în

unghi drept față de axul lung al trihomului, care apare — ca o consecință — uniseriat și neramificat (deși poate prezenta false ramificări).

Cianobacteriile din secțiunea V se reproduc prin ruperea la întîmplare a trihomului, cu formarea de hormogonii uniseriate și neramificate în momentul eliberării lor. Pe măsură însă ce creșterea progresează, unele diviziuni celulare se fac în planuri care nu sînt în unghi drept față de axul lung al trihomului.

Tabelul nr. 27

Caracterele cianobacteriilor din secțiunea IV (după Rippka, Stanier și colab., 1979)

Reproducere prin ruperea la întîmplare a trihomului și (la unele) prin germinarea akineților pentru a produce trihoame care nu se deosebesc de trihoamele vegetative mature	Heterochiștii sînt intercalați sau terminali ; poziția akineților (cînd există) este variabilă	Celulele vegetative sînt sferice, ovoide sau cilindrice *Anabaena*
		Celulele vegetative au formă de disc *Nodularia*
	Heterochiștii sînt exclusiv terminali și formați la ambele extremități ale trihomului ; akineții sînt totdeauna adiacenți heterociștilor	Celulele vegetative sînt izodiametrice sau cilindrice *Cylindrospermum*
Reproducere ca mai sus, ca și formarea de hormogonii care se deosebesc de trihoamele mature prin absența heterochiștilor și prin unul sau mai multe din următoarele caractere : mobilitate rapidă prin alunecare, dimensiuni celulare mai mici, forma celulei, vacuole cu gaze	Hormogoniile dau naștere la filamente tinere care poartă cîte un heterochist terminal la ambele extremități ale lanțului de celule	Celulele vegetative sînt sferice, ovoide sau cilindrice ; akineții (dacă se produc) nu se formează adiacent față de heterochiști, ci cel mai adesea în lanțuri. *Nostoc*
	Hormogoniile dau naștere la filamente tinere care poartă un heterochist terminal, numai la una din extremitățile lanțului de celule	Trihomul matur este format din celule cu grosime egală ; heterochiștii sînt predominant intercalați ; celulele vegetative sînt în formă de disc, izodiametrice sau cilindrice *Scytonema*
		Trihomul matur se îngustează de la bază, care poartă un heterochist terminal, spre apex ; celulele vegetative sînt în formă de disc, izodiametrice sau cilindrice. *Calothrix*

La cele din genul *Fischerella*, care au o structură filamentoasă în tot timpul creșterii, trihomul primar devine parțial multiseriat (cu o gro-

sime reprezentată de mai multe celule) și formează ramuri laterale uniseriate, compuse din mici celule cilindrice. În această fază a dezvoltării, continuitatea celulară a trihomului este adesea întreruptă de depunerea unui strat parietal fibros între celulele adiacente. Aceste întreruperi ale continuității celulare sînt evidențiate prin prezența frecventă a heterochiștilor terminali, într-o poziție intercalată în trihomul primar.

Hormogoniile, care sînt inițial uniseriate, neramificate și lipsite de heterochiști, se formează de la ramurile laterale. Diferențierea heterochiștilor într-un hormogoniu este aproape invariabil intercalară, în timp ce în trihomul matur sînt intercalați, terminali sau laterali. Heterochiștii laterali s-au diferențiat de la celule vegetative care s-au divizat într-un plan paralel cu axul lung al trihomului și prezintă un singur granul polar.

Deosebirea fundamentală dintre secțiunile IV și V, decurgînd din polaritatea diviziunilor celulare succesive, rezultă și din modul de germinare a akineților.

La cianobacteriile din secțiunea IV germinarea unui akinet dă naștere, prin diviziunea într-un singur plan, unui trihom uniseriat, din care, la unele genuri, prin diviziuni celulare rapide, se formează hormogonii.

La cianobacteriile din secțiunea V germinarea unui akinet produce prin diviziunea în mai multe planuri un agregat multicelular. Diviziunea ulterioară într-un singur plan duce la formarea de hormogonii (*Chlorogloeopsis*) sau la dezvoltarea de ramuri laterale (*Fischerella*), (tabelul nr. 28, fig. 165).

Tabelul nr. 28

Cianobacteriile filamentoase din secțiunea V (după Rippka, Stanier și colab., 1979)

Reproducere prin ruperea la întîmplare a trihomului, prin formarea de hormogonii și (dacă există) prin germinarea akineților	Hormogoniile formate din mici celule cilindrice care se măresc și devin sferice; heterochiștii se formează în poziții terminale și intercalați	Celulele din trihomul matur se divid în mai multe planuri; detașarea unor grupuri de celule asociate duce la formarea unor agregate neregulate (similare cu *Gloeocapsa*) care conțin heterochiști terminali; hormogoniile apar în astfel de agregate *Chlorogloeopsis*
	Hormogoniile compuse din mici celule cilindrice care cresc și devin rotunjite, heterochiștii se dezvoltă aproape exclusiv intercalați	Celulele din trihomul matur se divid în mai multe planuri pentru a produce trihoame parțial multiseriate, cu ramificații laterale uniseriate; heterochiștii din trihomul primar sînt predominant terminali sau laterali; hormogoniile sînt produse la capetele trihoamelor sau ale ramificațiilor laterale *Fischerella*

Ecologie. Cianobacteriile sînt microorganisme extrem de răspîndite în natură în apele dulci și marine, în lacuri sărate, izvoare termale și sol, precum și în mediile cele mai puțin ospitaliere (pe suprafața și în fisurile rocilor). Unele specii prezente în regiunile de deșert sînt termodure, avînd o creștere diurnă limitată la începutul dimineții și apoi oprită

cînd temperatura din cursul zilei creşte. Cianobacteriile prezente în izvoarele termale sînt termofile, dominante sau prezente în exclusivitate în mediile respective care pot ajunge pînă la temperatura de 75 °C.

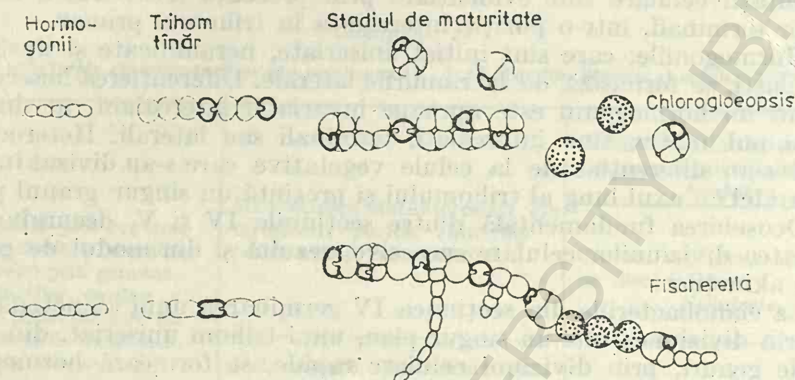


Fig. 165. — Reprezentarea schematică a genurilor din secţiunea V. Celulele cu pereţi groşi şi granule polare sînt heterochişti, iar cele cu conţinut punctat akineţi (după Rippka şi Stanier, 1979).

Numeroase specii produc ,,înflorirea'' apelor în lacurile eutrofizate bogate în substanţe nutritive, iar unele cianobacterii (de ex., din genurile *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* şi *Oscillatoria)* care trăiesc în apele dulci produc toxine puternice, determinînd o mortalitate ridicată la peşti, vite, păsări de apă, precum şi tulburări digestive grave sau chiar mortale la om, în cazul utilizării apelor respective ca apă de băut.

Cianobacteriile participă frecvent în procese de simbioză cu diferite organisme eucariote (muşchi hepatici, ferigi, licheni, corali, cicade etc.), iar cele fixatoare de N_2 intră în asociaţii simbiotice cu fungi şi alge verzi în formarea lichenilor, precum şi cu diferite plante verzi, ca briofite, pteridofite (feriga de apă *Azolla)*, gimnosperme şi chiar cu unele angiosperme *(Gunnera)*.

Datele paleontologice demonstrează că cianobacteriile sînt organisme foarte vechi, a căror prezenţă a fost înregistrată în precambrianul timpuriu ($3-4 \times 10^9$ ani). Au fost în mod deosebit abundente în precambrianul mediu, cînd dobîndind capacitatea de a folosi apa ca donator de electroni în fotosinteză au fost, probabil, răspunzătoare de oxigenarea iniţială a atmosferei terestre, condiţie probabil esenţială pentru evoluţia organismelor eucariote ale căror nevoi energetice sînt în mod normal dependente de respiraţia mitocondrială. După unele ipoteze, evoluţia lor endosimbiotică a dus la apariţia predecesorilor cloroplastelor şi la apariţia celulelor vegetale.

Diferenţierea celulară la bacterii

Termenul „diferenţiere'' este cel mai frecvent folosit pentru organismele multicelulare la care cuprinde întregul proces de modificări morfologice, structurale şi metabolice, ce duce treptat de la o singură celulă cu potenţialităţi multiple la organismul multicelular şi la funcţiile care fac posibilă existenţa sa şi, în final, la organele de reproducere şi celulele care asigură menţinerea speciei. Diferenţierea este astfel o proprietate fundamentală, componentă a dezvoltării ontogenetice în care este reflectată întreaga istorie filogenetică (Malék, 1967).

La organismele multicelulare, diferenţierea este un proces foarte complex, care poate fi abordat din punctul de vedere genetic, morfologic, fiziologic şi evolutiv.

Spre deosebire de plante şi animale, celulele procariote au, de regulă, un ciclu morfogenetic simplu, în care diviziunea reprezintă singurul eveniment evident. Singurele organisme procariote care prezintă grade diferite de diferenţiere sînt bacteriile sporulate, actinomicetele, bacteriile prostecate (inclusiv *Caulobacter* şi bacteriile care înmuguresc), *Arthrobacter*, *Myxobacter* şi cianobacteriile filamentoase.

Studiul procesului de diferenţiere la bacterii se loveşte de o serie de dificultăţi obiective, decurgînd din: a) dimensiunile mici (datorită cărora nu a putut fi studiat decît după descoperirea microscopului electronic); b) timpul scurt de generaţie; c) necesitatea de a lucra cu populaţii bacteriene şi nu cu celule individuale; d) proprietăţile specifice (forma, funcţiile etc.) ale bacteriilor sînt mult mai dependente de efectul condiţiilor de mediu, în aşa fel că uneori se poate determina numai cu greutate, dacă modificările înregistrate sînt datorită evoluţiei normale sau unui răspuns la condiţiile externe.

Datorită acestui fapt, termenul „diferenţiere'' este mai puţin cunoscut cînd este aplicat la bacterii, referitor la modificările în cursul dezvoltării unei celule din momentul formării ei pînă la diviziunea următoare sau în timpul formării unor celule speciale cum este sporul.

Whittenbury şi Dow (1977, 1980) propun următoarea semnificaţie şi utilizare a termenilor consacraţi, cînd sînt aplicaţi la procariote:

Morfogeneză — modificări în morfologia externă a celulei şi în arhitectura internă în timpul ciclului celular.

Diferenţiere — evenimente iniţiate de un mecanism „comutator" în ciclul celular, ducînd la formarea unui nou tip de celulă. Celulele diferenţiate pot reveni la forma lor originară (de ex., sporul germinează) sau rămîn permanent în starea respectivă (de ex., heterochiştii la cianobacterii).

Dezvoltare — situaţie complexă implicînd morfogeneza şi diferenţierea sub influenţe intercelulare, ca în cazul unor mixobacterii şi cianobacterii, cînd unele celule sînt modificate pentru a face o anumită funcţie particulară, necesară activităţii unui complex multicelular.

În raport cu modul lor de comportare, în cursul evoluţiei, în culturi sau în mediile lor naturale, celulele procariote pot prezenta următoarele tipuri de cicluri celulare:

Tipul de celulă vegetativă monomorfă corespunde bacteriilor care există totdeauna numai sub formă de celule vegetative şi la care există un singur tip morfologic distinct de celulă, format în condiţiile unui regim normal de nutriţie şi activitate fiziologică (de ex., *E. coli)*.

Ciclul celular de tip dimorfic corespunde celulelor procariote care prin diviziune formează două celule ce diferă unele de altele ca formă *(Caulobacter)*, (fig. 166), mărime (unele cianobacterii filamentoase), posedarea de către una din celule a unui apendice celular (spre ex., celulele care „roiesc" la *Rhodopseudomonas acidophila* au un flagel pe care celula-mamă nu îl posedă) sau printr-o combinaţie a acestor caractere.

Ciclul celular vegetativ polimorf corespunde bacteriilor care în regim diferit de nutriţie şi activitate fiziologică produc două sau mai multe tipuri de celule morfologic distincte, fiecare suferind, la rîndul său, un ciclu celular distinct şi constant (de ex., *Arthrobacter*, *Sphaerotilus*, *Rhodomicrobium*, *Geodermatophilus*, *Hyphomicrobium* ş.a.) (fig 167).

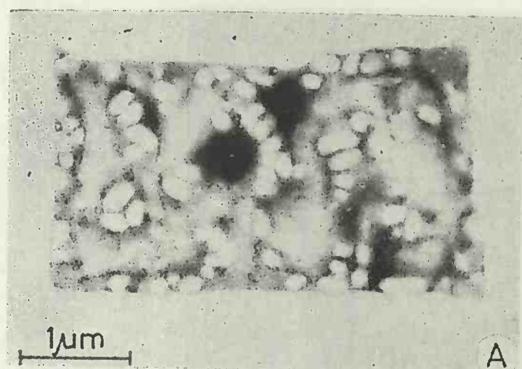
Ciclul sporal sau de chist caracterizează bacteriile care pot prezenta un ciclu suplimentar — reprezentat de sporogeneză — care se adaugă celulelor vegetative. Ciclul sporal se poate observa fie la bacterii cu ciclu vegetativ monomorf, cum sînt bacilii, fie la bacterii cu ciclu celular polimorf, ca *Rhodomicrobium*.

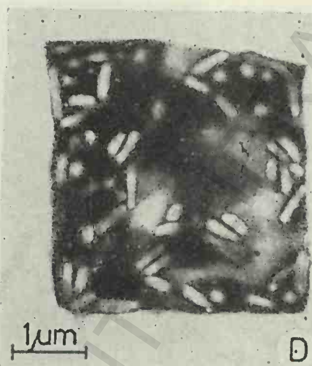
În raport cu modul de comportare a celulelor rezultate din diviziune, Whittenbury şi Dow (1977, 1980) deosebesc la celulele procariote trei nivele de organizare:

Nivelul unicelular corespunzînd bacteriilor la care fiecare organism individual normal se comportă independent din punctul de vedere structural şi funcţional (inclusiv multiplicare). Situaţia se aplică şi celulelor individuale care formează grupări caracteristice (de ex., diplococi, streptococi etc.).

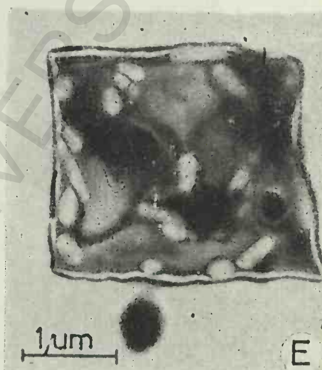
Cooperarea intercelulară ocazională este întîlnită în cazul bacteriilor capabile să ducă o existenţă unicelulară, dar care pot prezenta procese de cooperare intercelulară, cu formare de structuri multicelulare (de ex., corpii fructiferi ai unor specii de *Myxobacter)*.

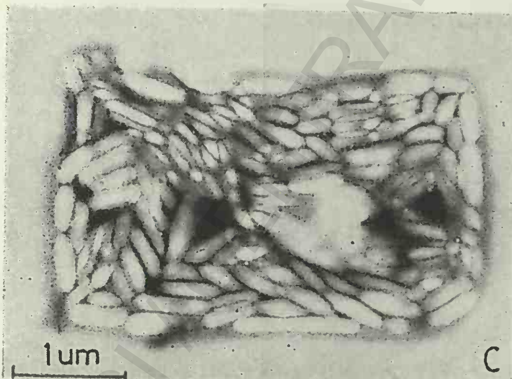
Procariotele „multicelulare" („coloniale") reprezintă o categorie de bacterii cu capacitatea (nu neapărat obligatorie) de a se diferenţia şi

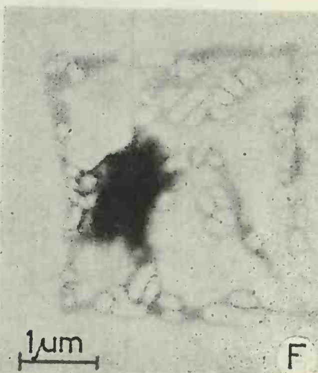




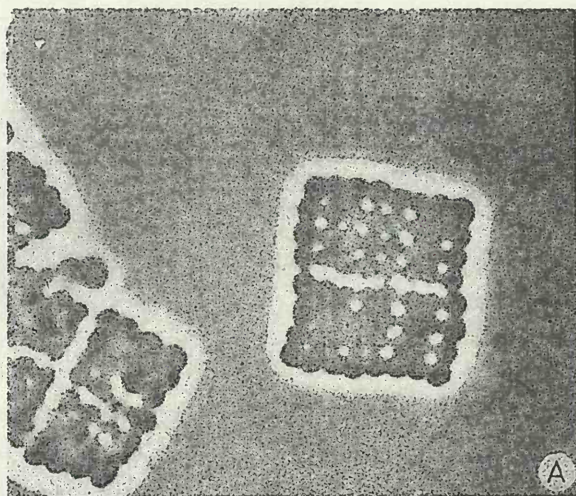


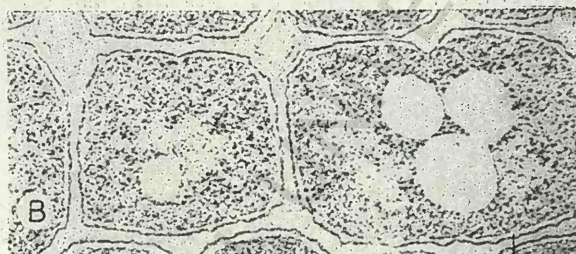


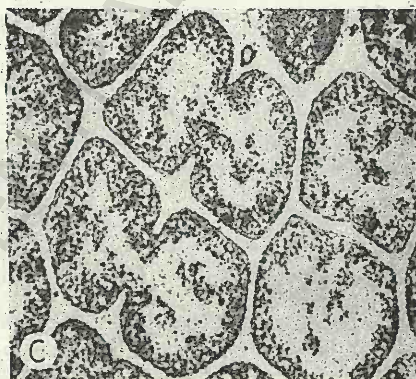




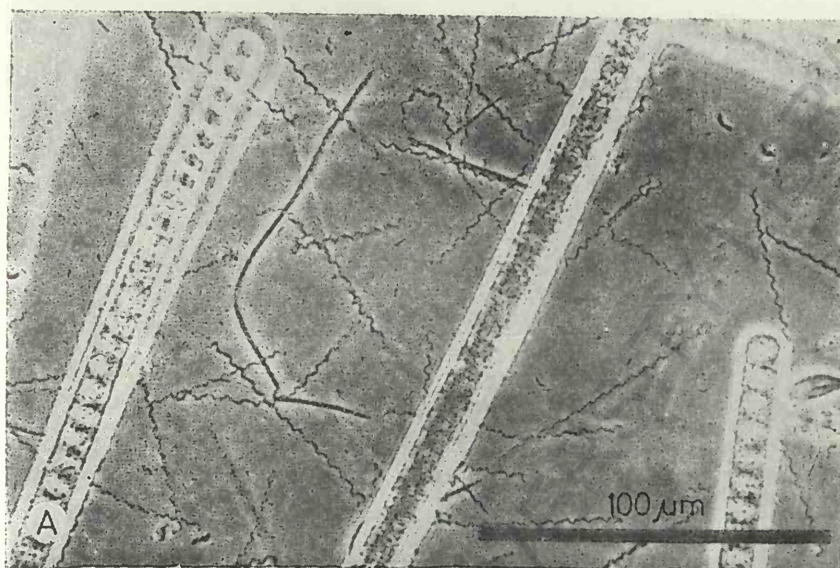
Pl. 40 — Micrografii electronice ale unor bacterii pătrate, prezentînd variaţiile de formă şi aşezarea veziculelor cu gaze: A—C. Celule rectangulare: A: vezicule cu gaze, scurte, fusiforme; B: vezicule cu gaze periferice suprapuse pe cristale de sare; C: celule cu peste 120 de vezicule cilindrice. D—F: Celule cu formă pătrată: D: fără teacă de înveliş; E: celule cu o teacă fină, F: celule cu o teacă înconjurătoare bine dezvoltată (după Parkes şi Walsby, 1981).

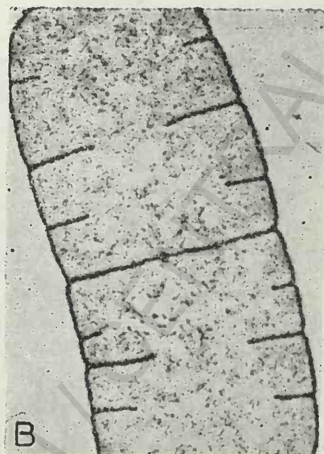


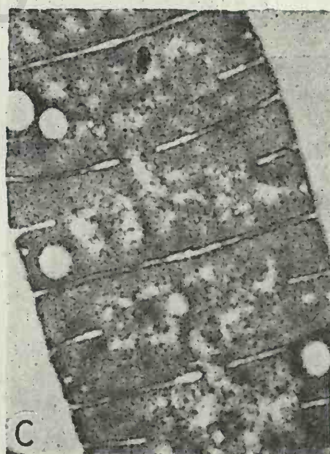




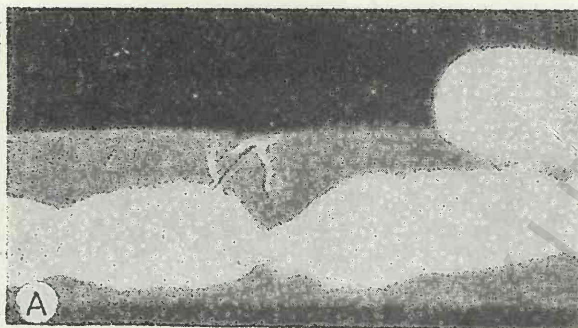
Pl. 41 — *Lampropedia hyalina.* A. Imagine în contrast de fază. B. Microelectronografie prezentînd detalii ale complexității peretelui celular. Zonele clare din citoplasmă corespund depozitelor de poli-β-hidroxibutirat (după Panghorn și Starr, 1966). C. Secțiune în planul unei „tablete" evidențiind diviziunea și volumul relativ mare al nucleoplasmei, precum și substanța matricială care separă celulele adiacente (după Murray și Lanys, 1963).

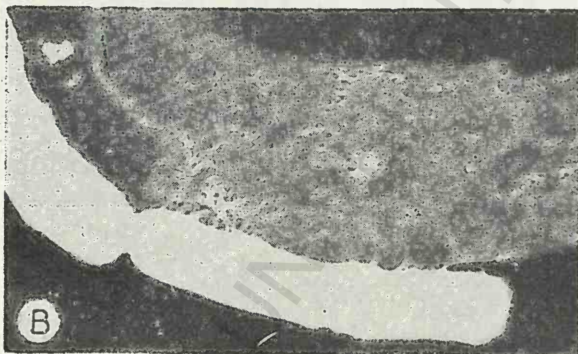


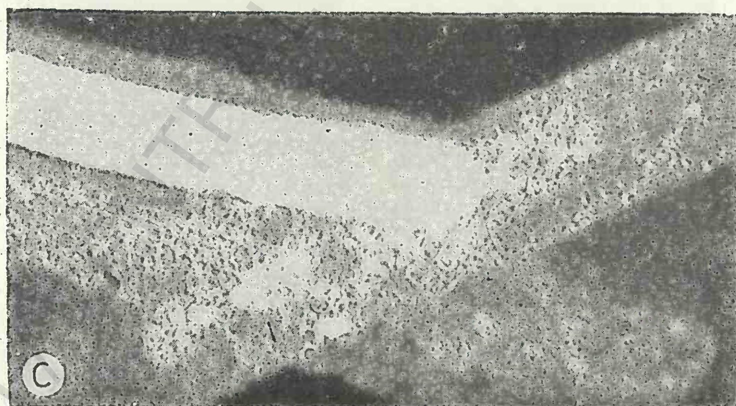




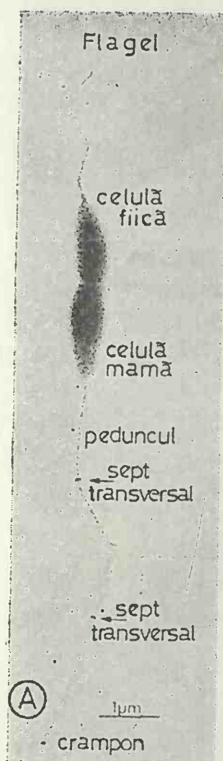
Pl. 42 – Bacterii filamentoase. A. *Beggiatoa* – trihoame asociate cu spirochete (contrast de fază) (după Blakemore, 1973). B. C. *Caryophanon latum*, secţiune fină evidenţiind straturile învelişului celular şi septurile transversale (după Trentini, 1978).

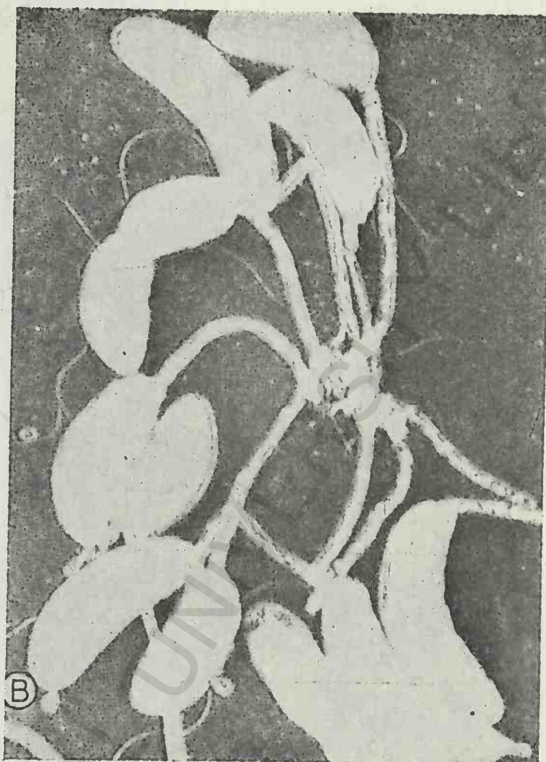


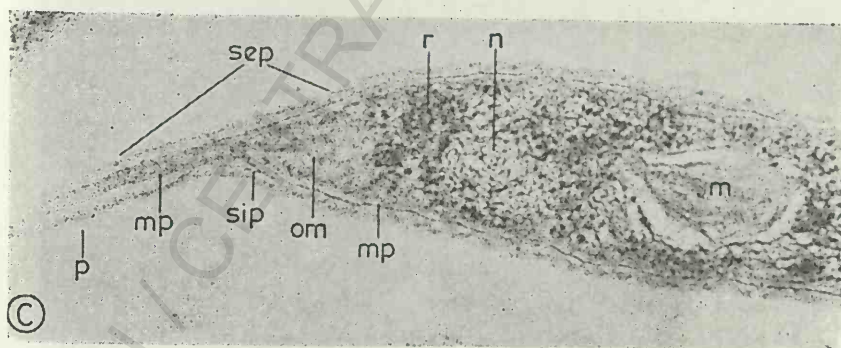




Pl. 43 — Structura de suprafaţă a „tecilor" la bacterii. **A.** *Sphaerotilus natans*. **B.** *Leptothrix lopholea*. **C.** *L. cholodnii* (după van Veen, Mulder şi Deinema, 1978).

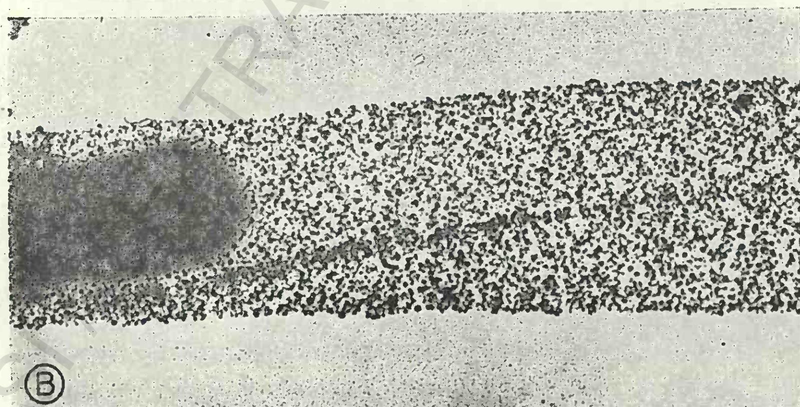






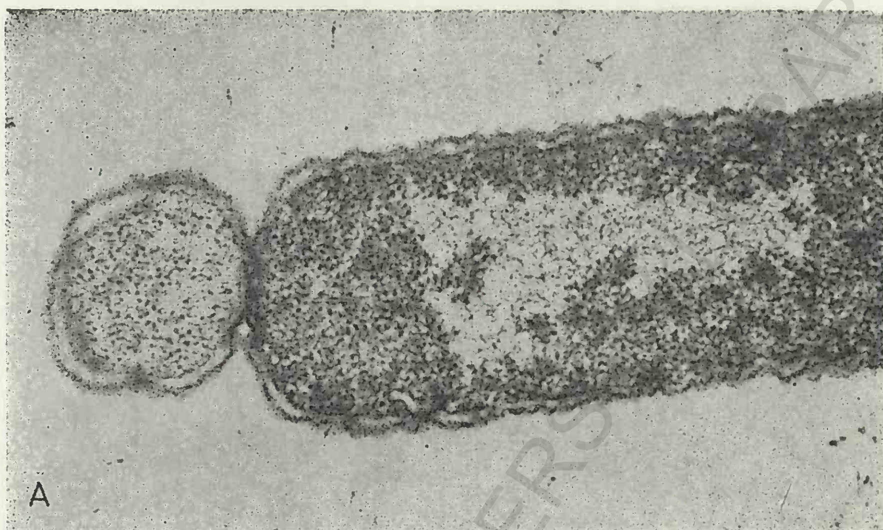
Pl. 44 — *Caulobacter*. **A.** Constituenţii unei celule prostecate (după Whittenbury şi Dow, 1977). **B.** Celule pedunculate grupate într-o rozetă, reunite prin extremităţile adezive (crampon) ale penduncullilor (după Poindexter, 1964). **C.** *Caulobacter bacteroides*. Secţiune longitudinală a unei celule pedunculate, evidenţiind continuitatea stratului extern al peretelui celular bacterian cu cel al pedunculului şi structurile componente (după Poindexter, 1964) : n = nucleu ; r = ribosomi ; mp = membrana plasmatică ; m = mezosom ; om = organit membranos ; p = peduncul ; sip = stratul intern parietal ; sep = stratul extern parietal.

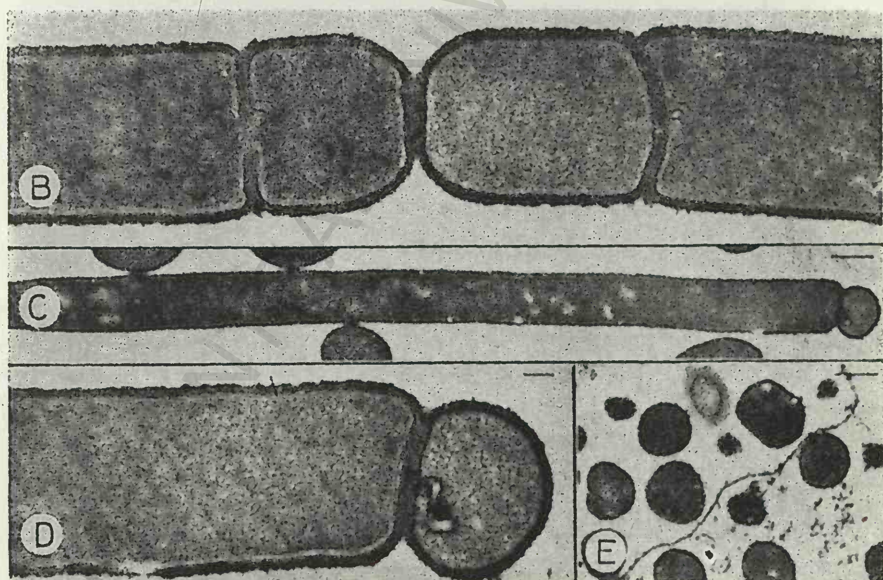




Pl. 45 — A. *Rhodomicrobium vannielii*—microelectronografia unor celule mature, conectate prin filamente. Se observă septurile transversale electrondense (S) şi o celulă-fiică pe cale de formare din filamentul unei celule-mamă (după Boatman şi Douglas, 1961).

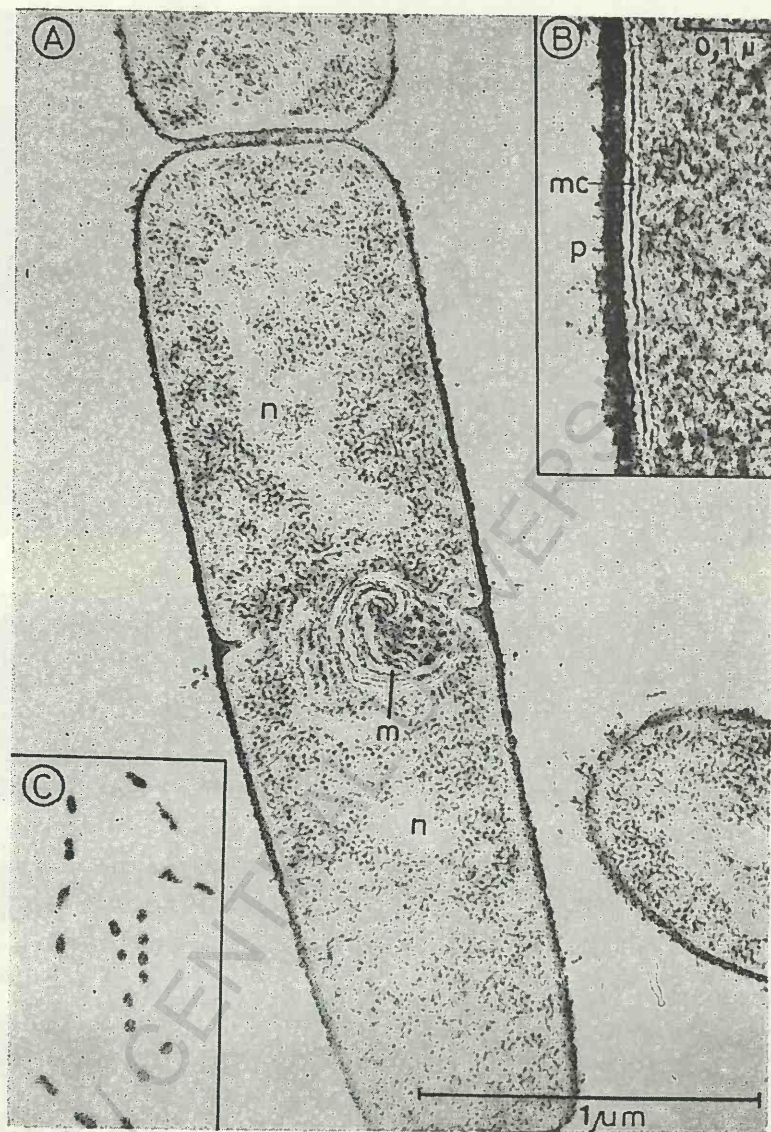
B. *Leptothrix ochracea* — cu teaca impregnată cu hidroxid feric (după Mulder, 1972).



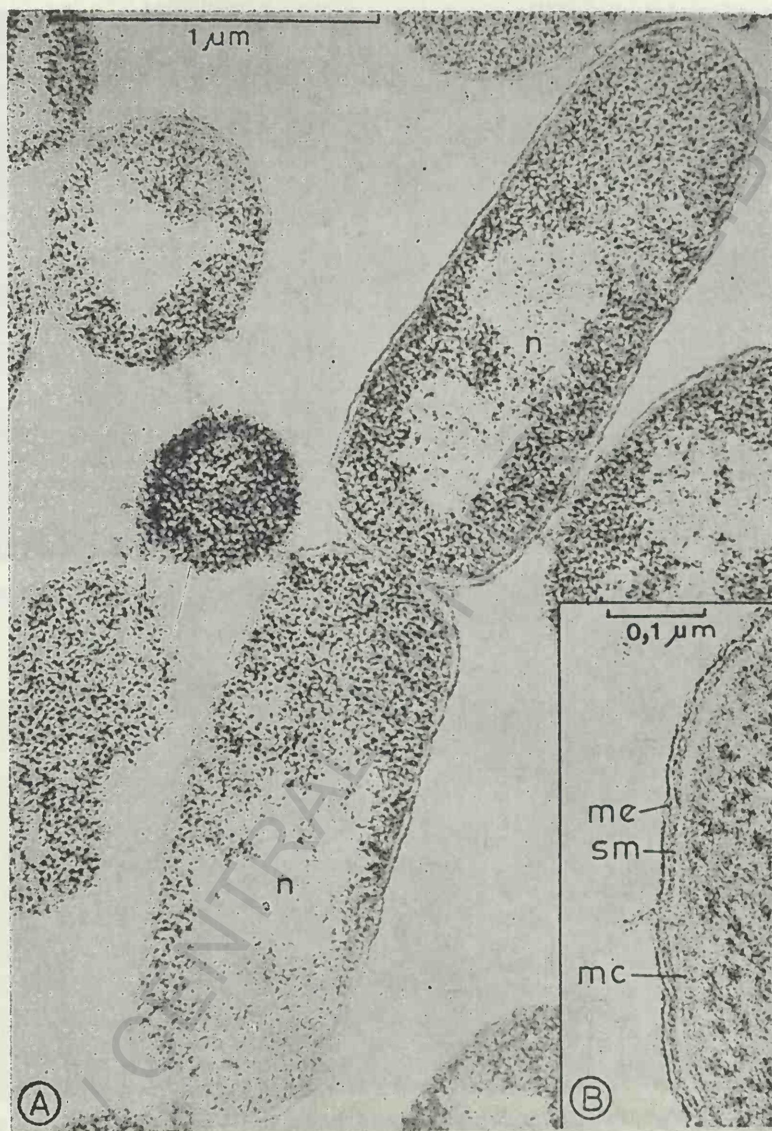


Pl. 46 — **A.** Secțiune fină printr-o celulă de *E. coli* X (producătoare de minicelule), pe cale de diviziune pentru a produce o minicelulă (după Allison, din Frazer și Curtiss, 1975).

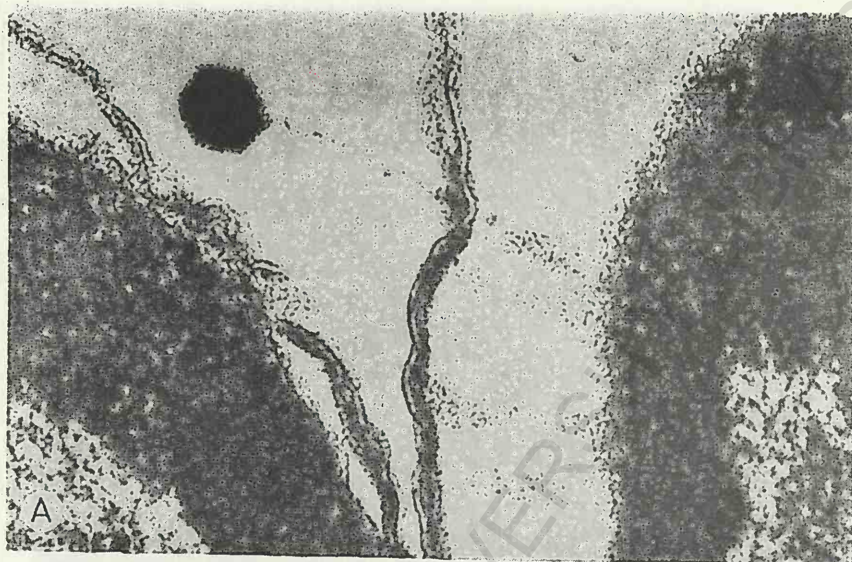
Secțiuni fine printr-o celulă de *B. subtilis*, tulpina CU-403. Minicelule adiacente formate din polii apropiați ai unor bacterii. **C.** Minicelulă terminală la capătul unui filament bacterian. **D.** Porțiune din B, mărită, pentru a evidenția mezosomul legat de septul minicelulei. **E.** Minicelulele izolate (după Reeve, din Frazer și Curtiss, 1975).

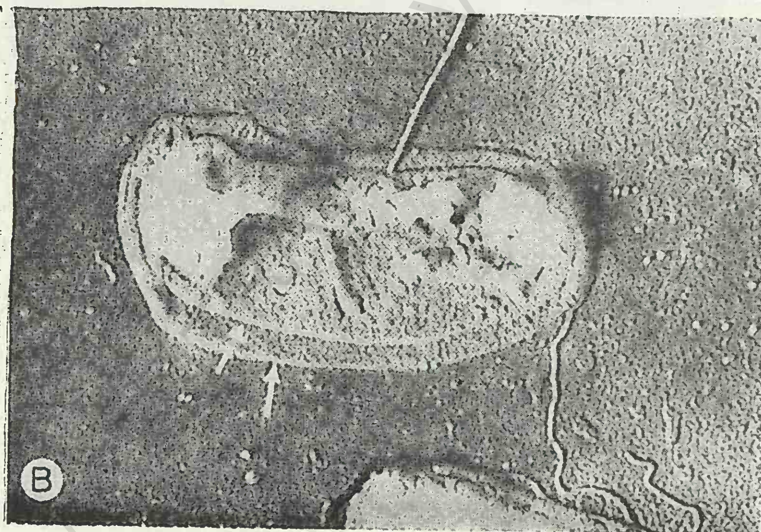


Pl. 47 — *Bacillus subtilis*. A. Secţiune ultrafină evidenţiind citoplasma, zonele nucleare (n) şi mezosomul (m). B. Detaliu de structură a peretelui celular (p) şi membranei citoplasmatice (mc). C. Celule examinate la microscopul fotonic după coloraţie selectivă nucleară (după Ryter, 1975).



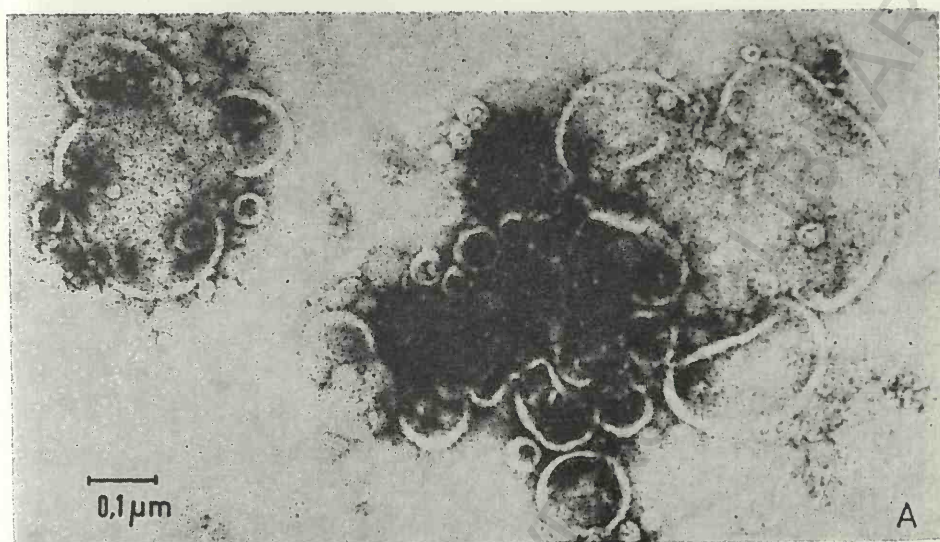
Pl. 48 — *Escherichia coli* (secţiune ultrafină). **A** : n = nucleoidul înconjurat de citoplasmă. **B.** Detaliu de structură a peretelui celular : mc — membrana citoplasmatică ; sm — stratul mureinic ; me — membrana externă a peretelui celular (după Ryter, 1975).

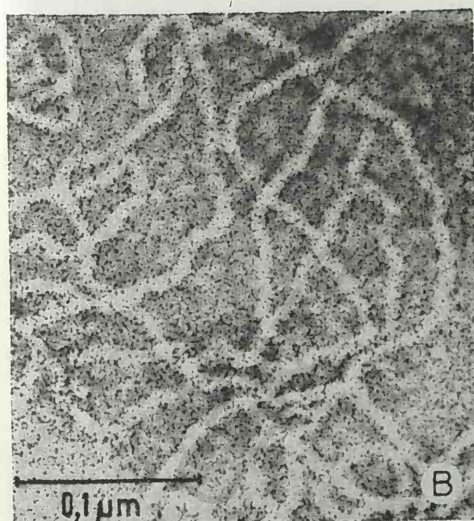


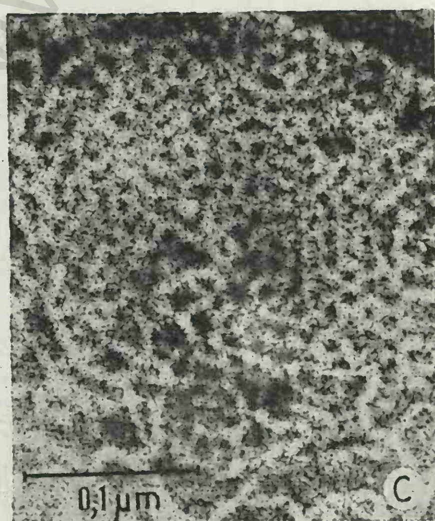


Pl. 49 — A. Celulă de *E. coli* B plasmolizată după infecţia cu fagul T5. Se observă profilul peretelui celular şi punţile de contact cu membrana plasmatică (după Bayer, 1977).

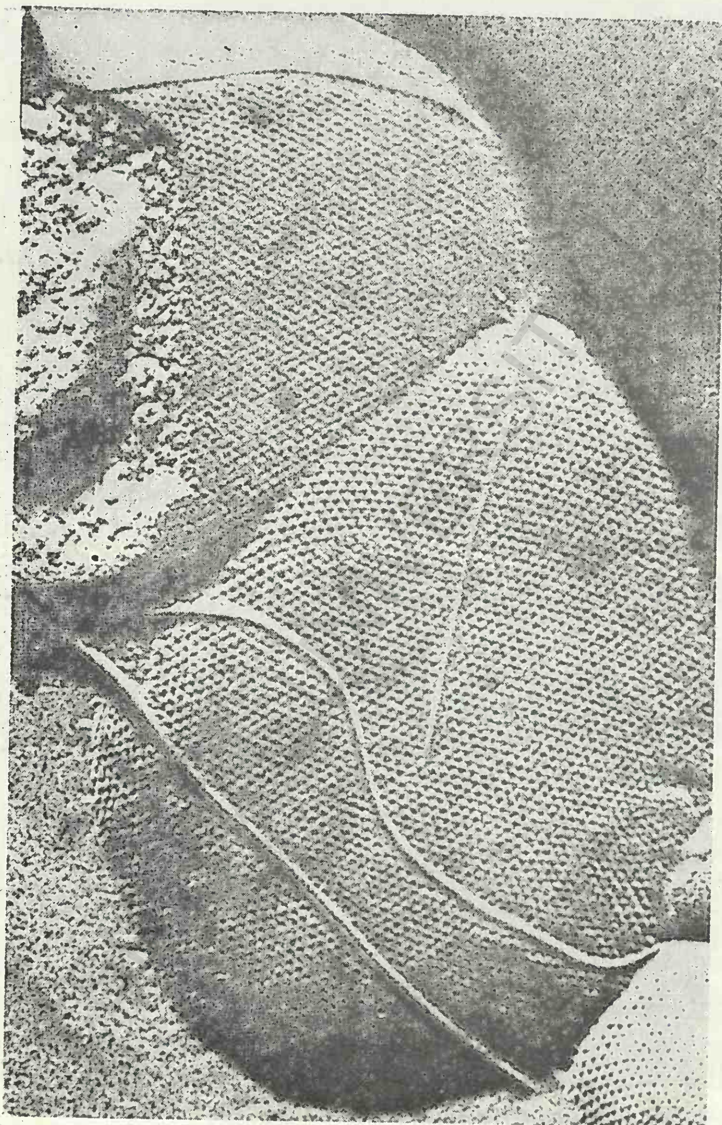
B. *Vibrio cholerae* pe cale de autoliză. Săgeţile indică peretele celular (la exterior) şi membrana citoplasmatică (în interior) (după Scanga, 1944).



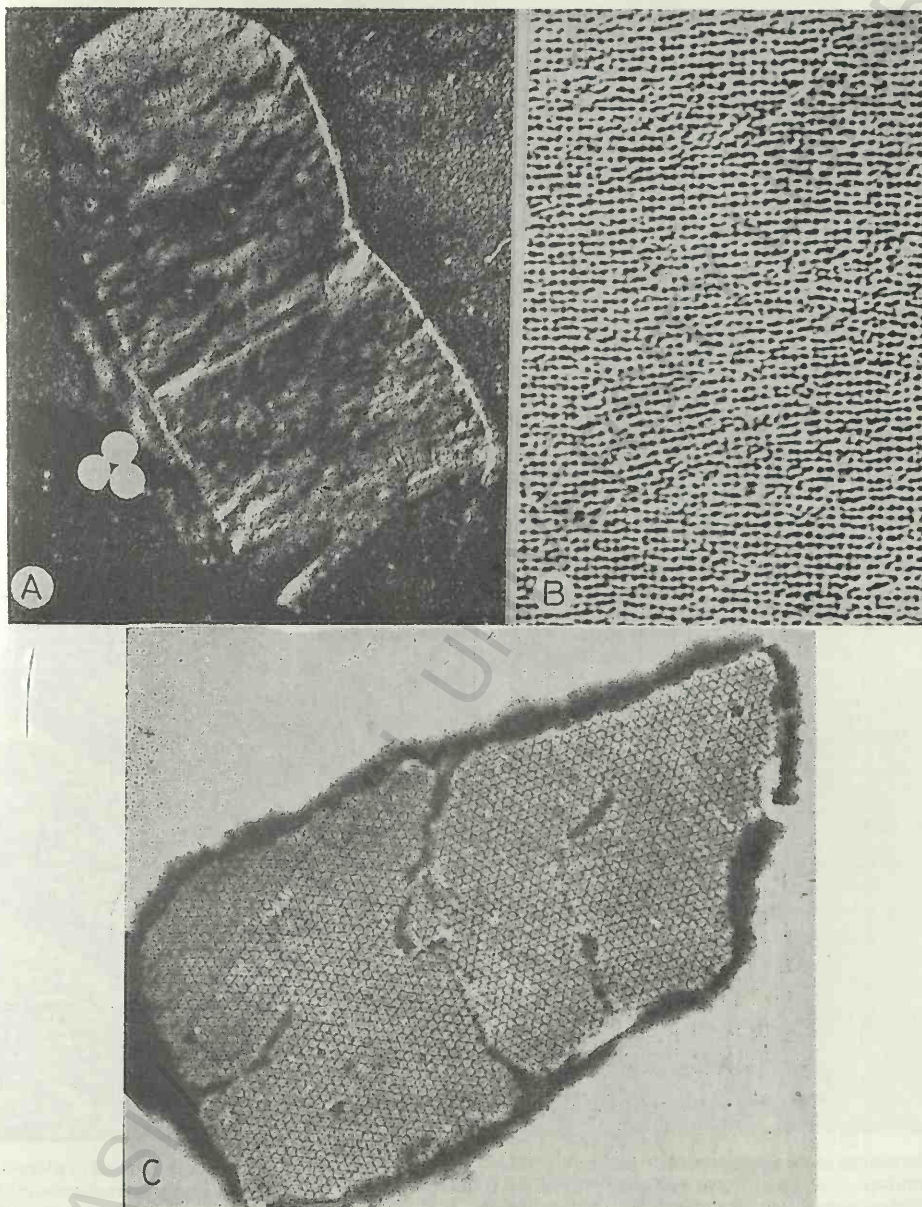




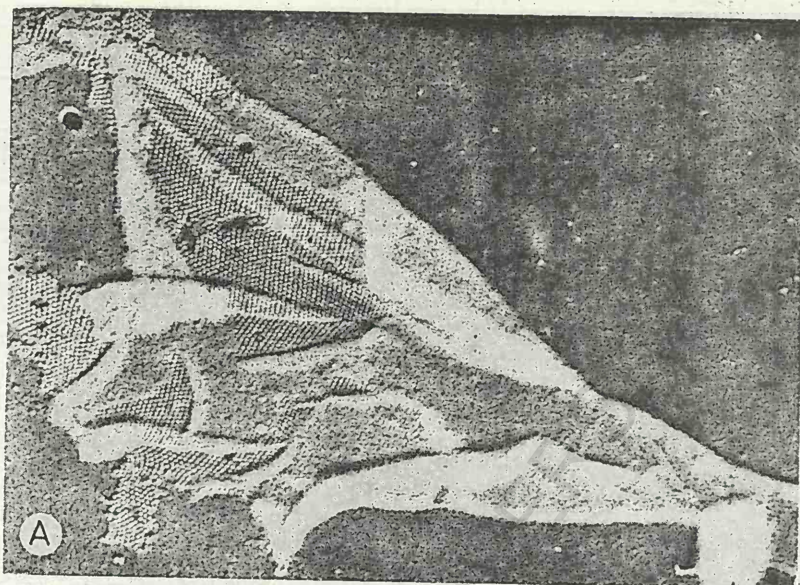
Pl. 50 — *Rhodopseudomonas capsulata*. Complex lipopolizaharid—proteină—lipide izolat din membrana externă a peretelui celular (A). Lipopolizaharid sub formă de agregate filamentoase (B) şi sub formă de agregate în reţea (C) (după Weckesser şi colab., 1972).

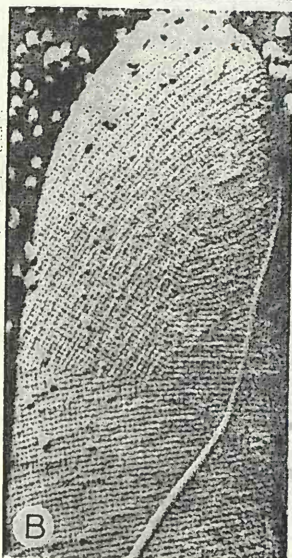


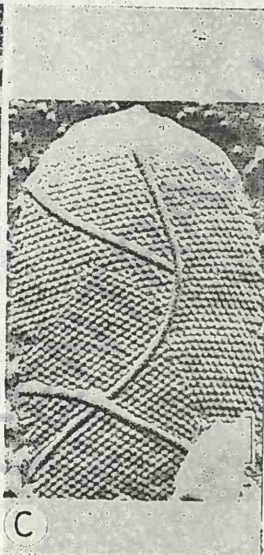
Pl. 51 — *Methanogenium marisnigri.* Microelectronografic evidenţiind aşezarea în mozaic a subunităţilor proteice (după Mayer din Voese 1981).



Pl. 52 — **A.** *Bacillus megaterium.* Perete celular izolat (microelectronografie după Salton, 1964). **B.** Structura fină a peretelui celular la *B. polymyxa,* evidenţiind aranjarea ordonată a moleculelor de mucopolipeptid (după Baddiley, 1972). **C.** Perete celular bacterian prezentînd crăpături după dezintegrare cu ultrasunete. Se observă structuri poligonale grupate regulat dispuse pe un strat subiacent vizibil şi prin crăpături (după Murray, 1970).

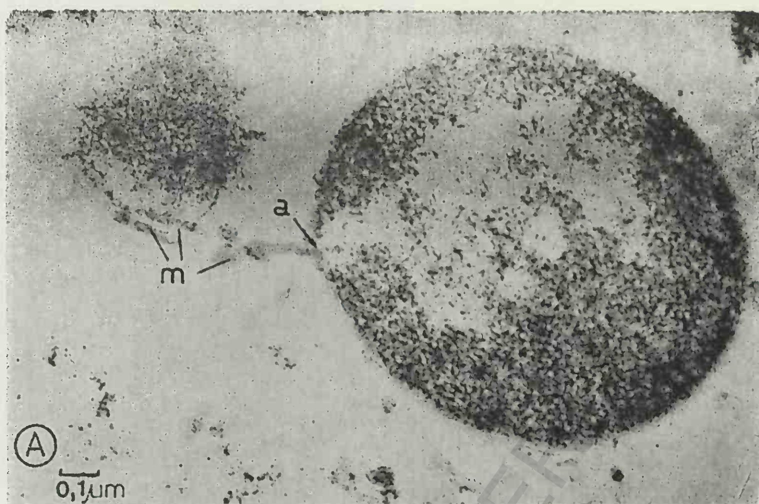


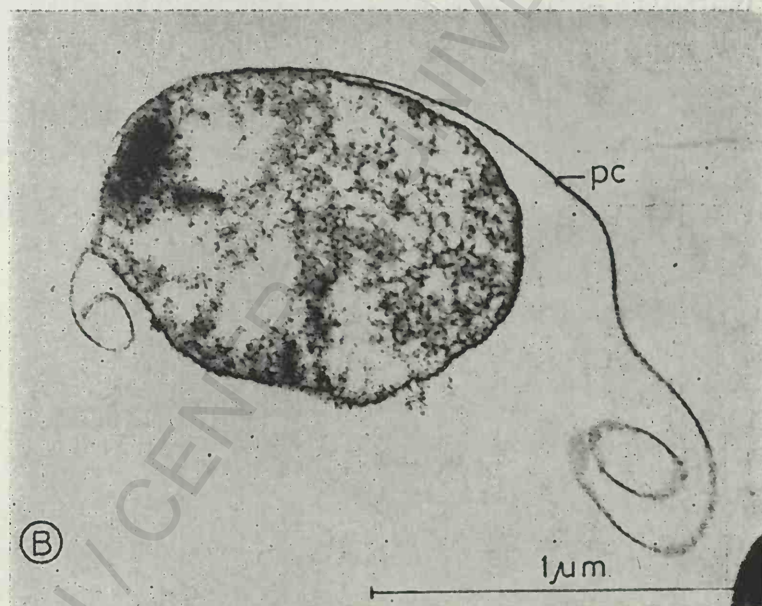




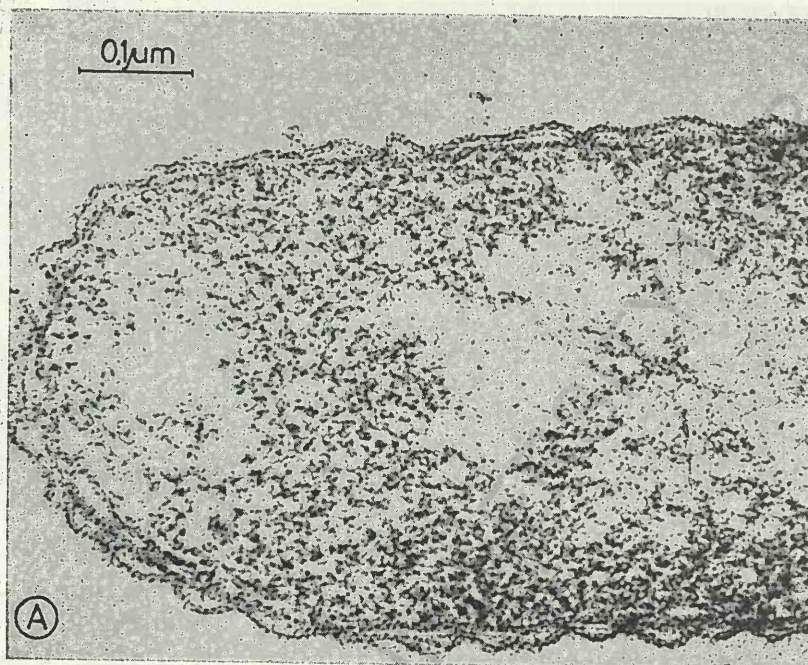


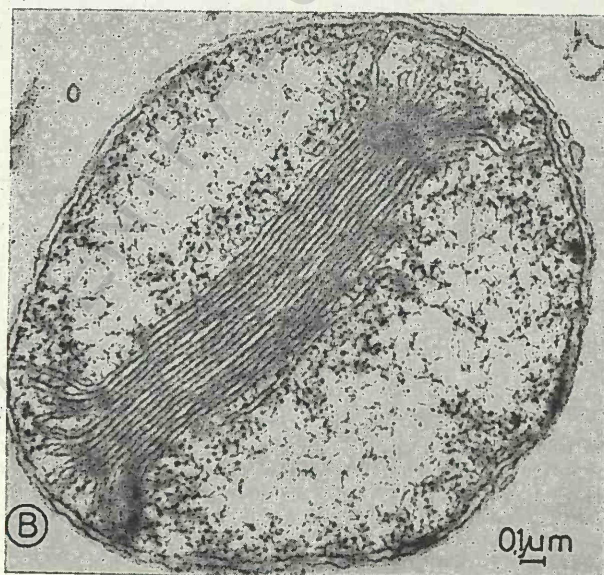
Pl. 53 — **A.** Structura submicroscopică a peretelui celular la *Spirillum serpens* : în stînga suprafaţa externă ; în dreapta suprafaţa internă (microelectronografie după Houwink, 1957). **B.** *Clostridium thermosaccharolyticum* : microelectronografia peretelui celular cu tehnica de îngheţare-fracturare, evidenţiind aranjamentul regulat tetragonal al subunităţilor componente modificat spre polii celulei. **C.** *Cl. thermohydrosulfuricum* — subunităţile sînt grupate după o simetrie hexagonală, modificată la extremităţile celulei. În ambele cazuri se observă flageli pe suprafaţa celulei (după Thorney şi Glauert, 1974). **D.** Structura periodică rectangulară a suprafeţei interne a peretelui celular la unele bacterii (microelectronografie după Houwink 1957),



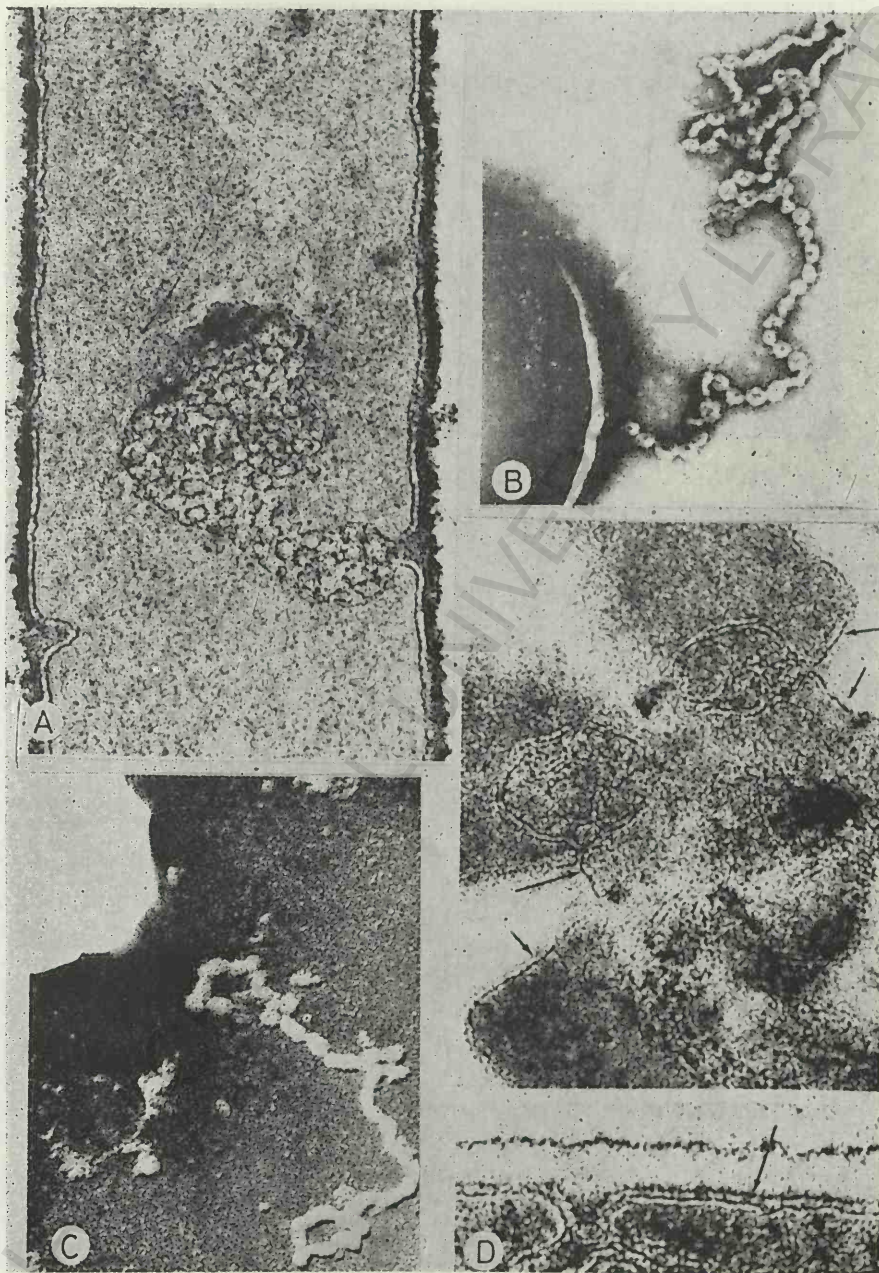


Pl. 54 — A. Protoplast de *Bacillus subtilis*. Citoplasma este înconjurată numai de membrana plasmatică. a. — legătura dintre nucleu și membrana plasmatică; m — tubuli mezosomali extrudați (după Ryter, 1975).
B. Secțiune printr-un sferoplast. pc — perete celular parțial desprins de celula bacteriană (după Ryter, 1975).

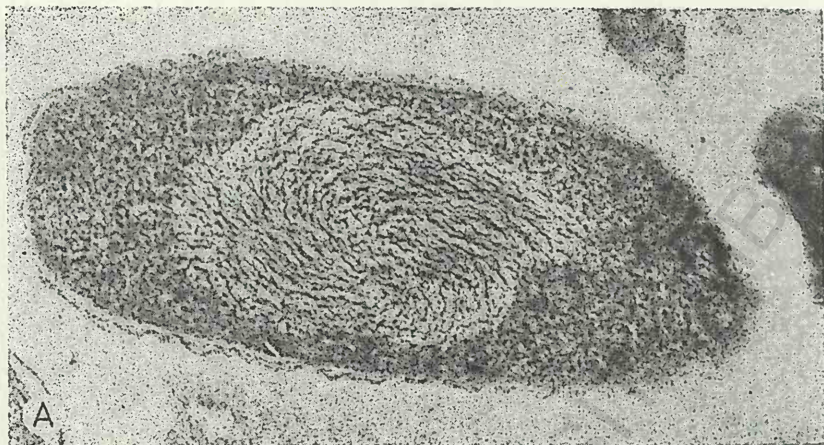


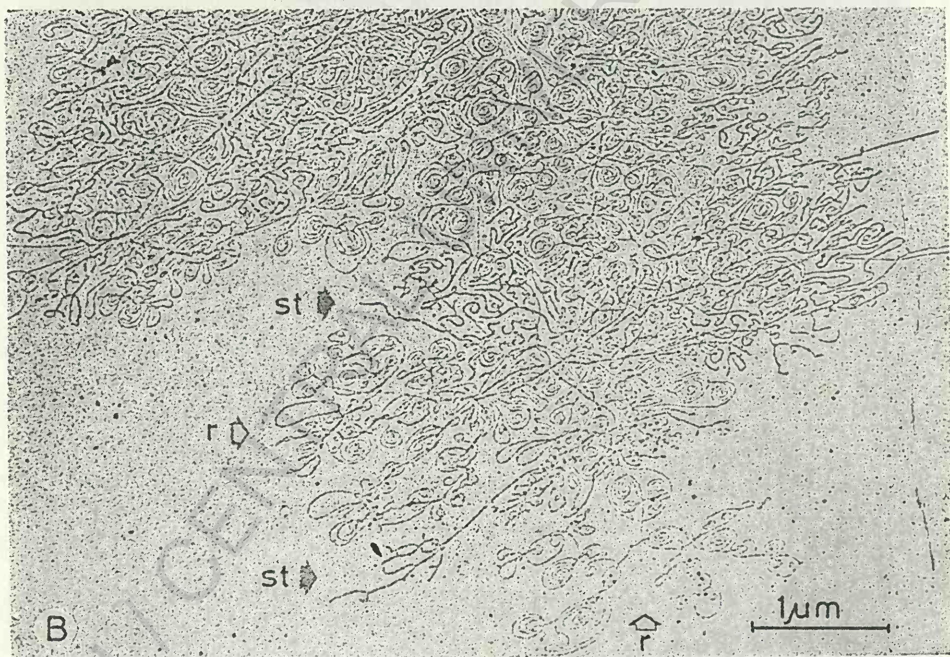


Pl. 55 — A. *Escherichia coli B.* Microelectronografie evidenţiind prezenţa membranei citoplasmatice şi structura fină a citoplasmei (după van Iterson, 1965). B. *Nitrosococcus oceanus* prezentînd sisteme de membrane paralele care conţin echipamentul enzimatic necesar pentru respiraţie.

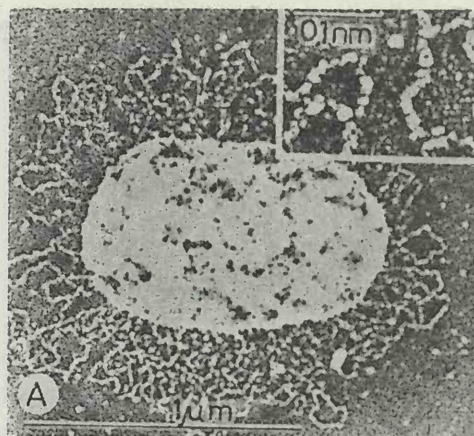


Pl. 56 — **A.** Secţiune transversală printr-un mezosom de *B. subtilis*, evidenţiind legătura cu membrana plasmatică (van Iterson, 1965). Protoplaşti de *B. subtilis* (**B**) şi *B. megaterium* (**C**) legaţi de mezosomi extrudaţi, avînd forma unor apendice lungi, cu aspectul unui şir de mici vezicule sau de şirag de perle (după Ryter, 1968). **D.** Secţiune ultrafină în zona de formare a mezosomilor : săgeţile mari indică stratul extern al membranei plasmatice care participă la formarea mezosomilor. Peretele celular este colorat slab, exceptînd o bandă cu densitate medie, omogenă şi neregulată care pare să pătrundă în baza mezosomului. Săgeţile mici indică stratul cel mai profund al peretelui celular (după Granboulan 1965).



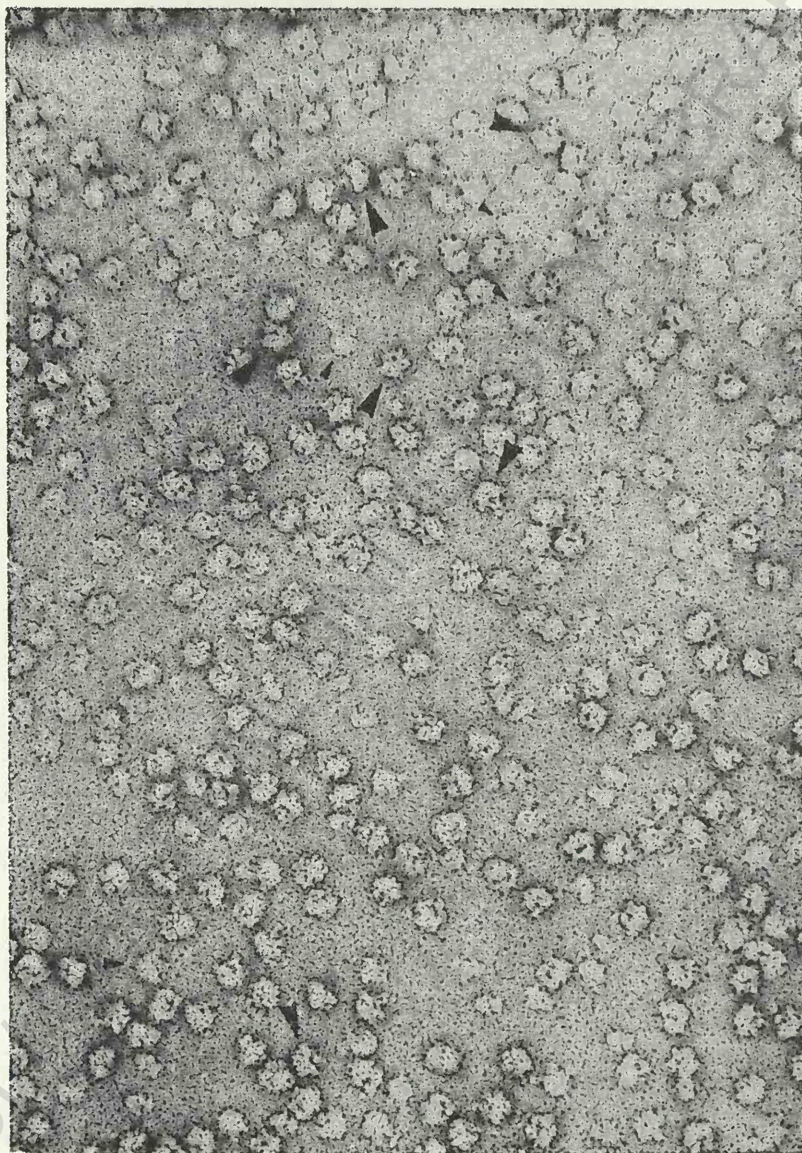


Pl. 57 — A. Structura fibrilară a materialului nuclear la *Agrobacterium tumefaciens* (după Ryter, 1965).
B. Cromosom de *E. coli* eliberat din celulă după liză menajată. Se observă, pe lîngă plierea ADN, porţiuni cu grad ridicat de superhelice (st) şi zone „relaxate" (r) în care aspectul superhelical şi pliat a dispărut (microelectronografie după Delius şi Worcel, 1973).

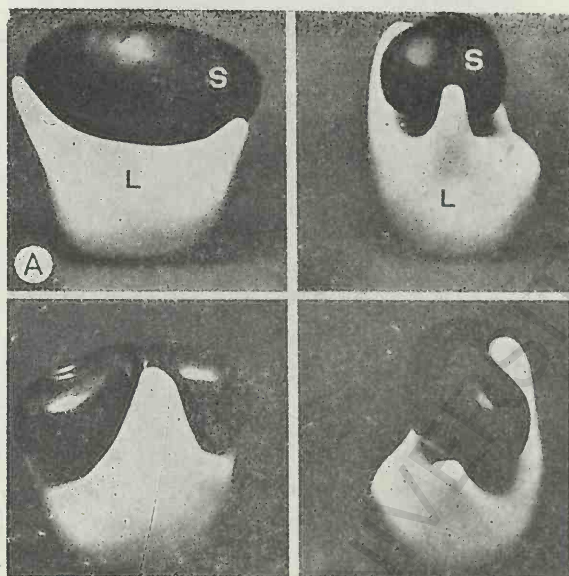


B

Pl. 58 — A. ADN de *E. coli* cu aspect fibrilar, ca mărgele condensate, obținut prin distrugerea celulelor din faza logaritmică tardivă, direct pe pelicula suport. În chenar, mărirea unei fibre de 12 nm (microelectronografie după Griffith, 1976). B. Radioautografia cromosomului de *E. coli* în curs de replicare, după marcare cu timidină titriată (după Cairns, 1963).

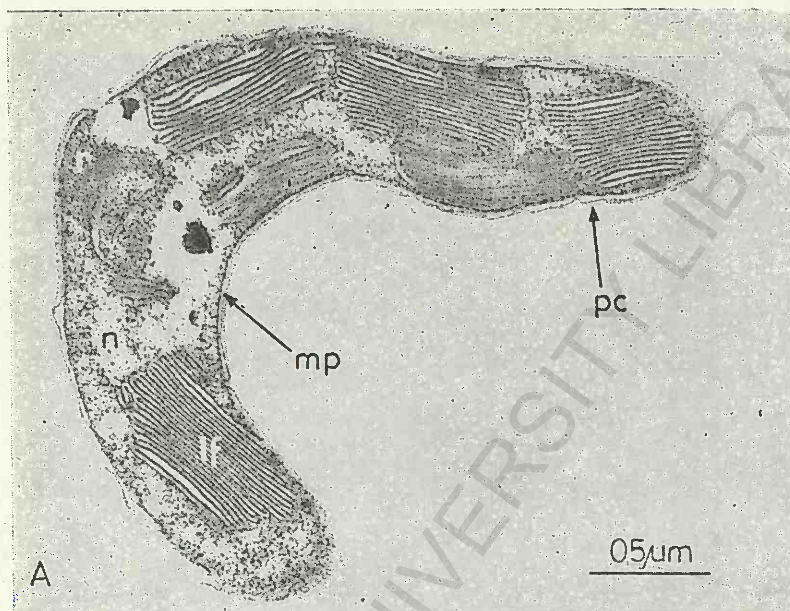


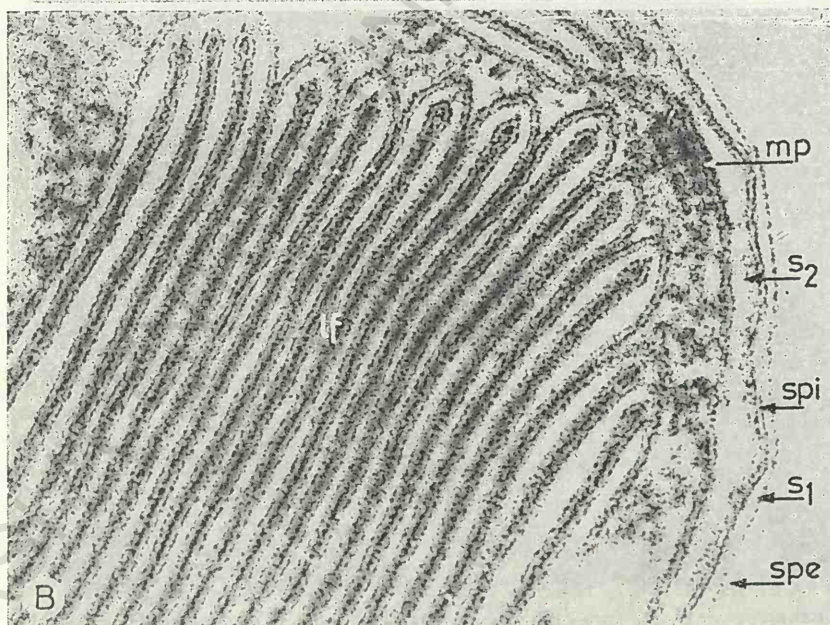
Pl. 59 — Ribosomi de *E. coli*. Microelectronografia ribosomilor 70S și a subunităților 50S și 30S (după Lake, 1976).



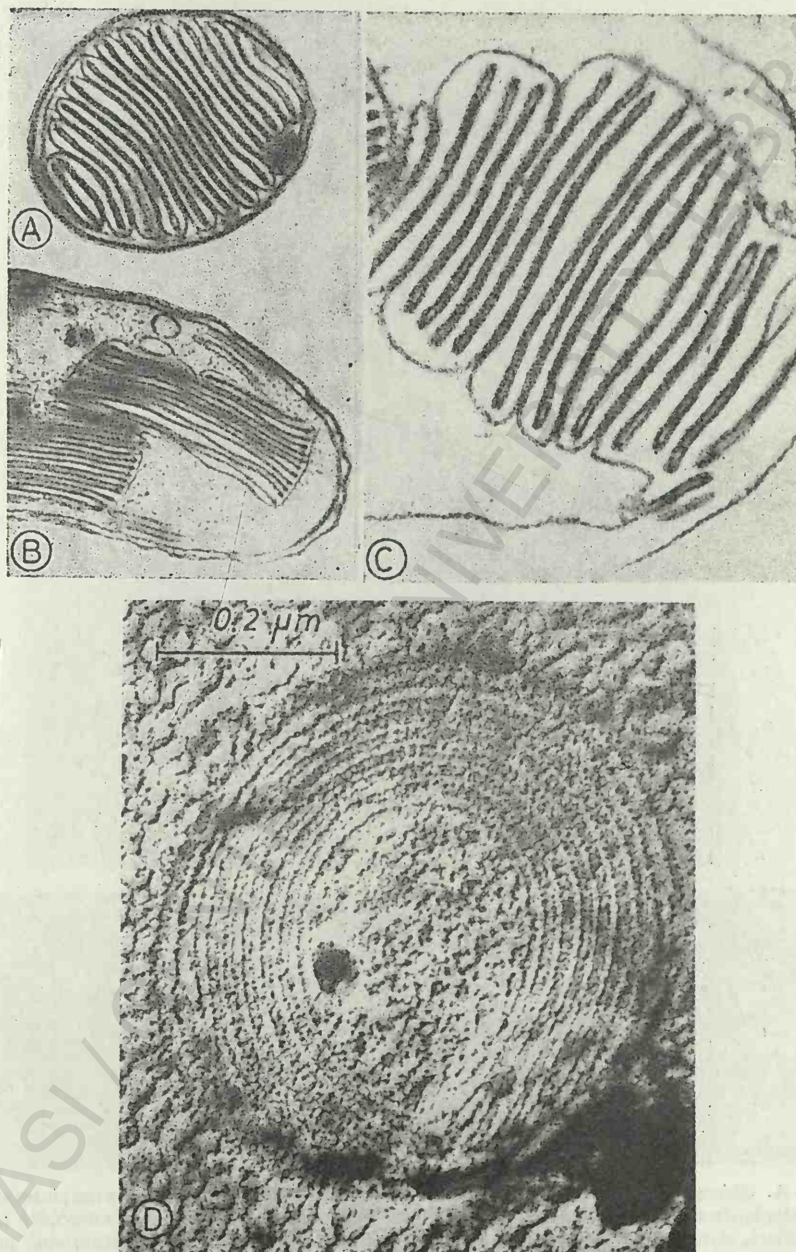


Pl. 60 — A. Modele de structură ale ribosomilor 70S *E. coli* văzute din 4 unghiuri diferite cu 90° : S — subunitatea mică ; L — subunitatea mare (Boublik şi Kleinschmidt, 1976). B. Poliribosomi de *E. coli*. Microelectronografia unei zone din celulă (după Kingsbury şi Volez, 1969).

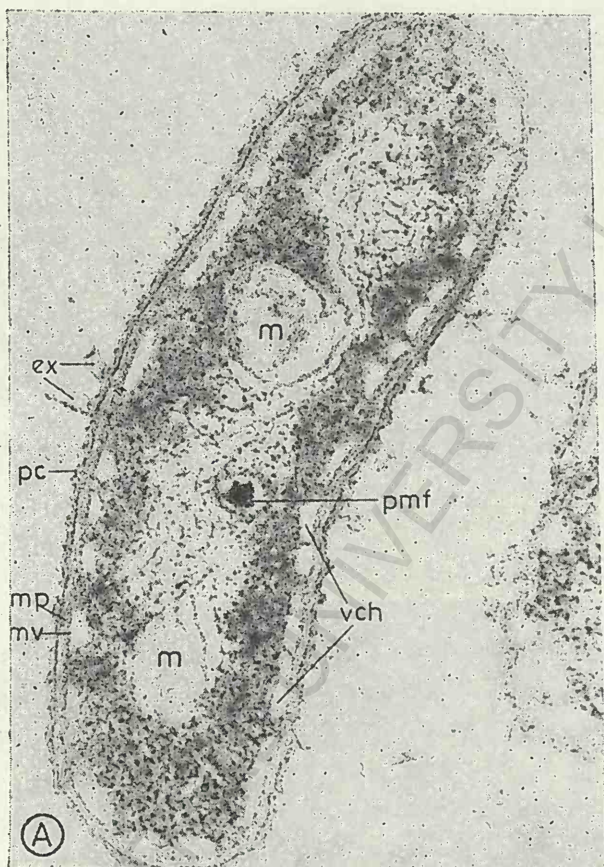


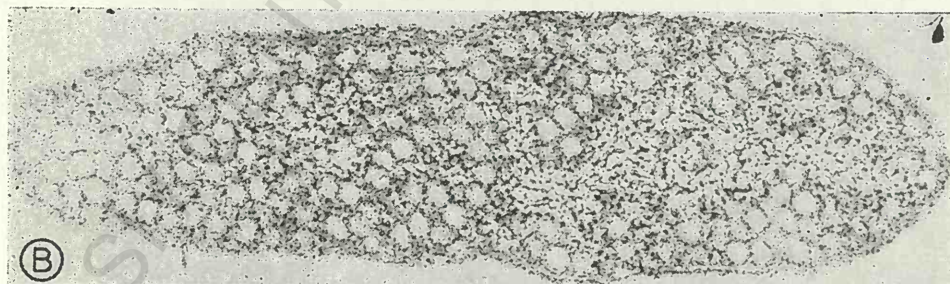


Pl. 61 — A. Structura aparatului fotosintetic la *Ectothiorhodospira mobilis*: pc = perete celular; mp — membrana plasmatică; lf — „pachete" de lamele fotosintetizante; r — ribosomi; n — nucleoplasma. B. Detaliu de structură: spi — stratul parietal intern; spe — stratul parietal extern; s1 și s2 — spații intermediare ale peretelui celular (după Remsen și colab., 1968).



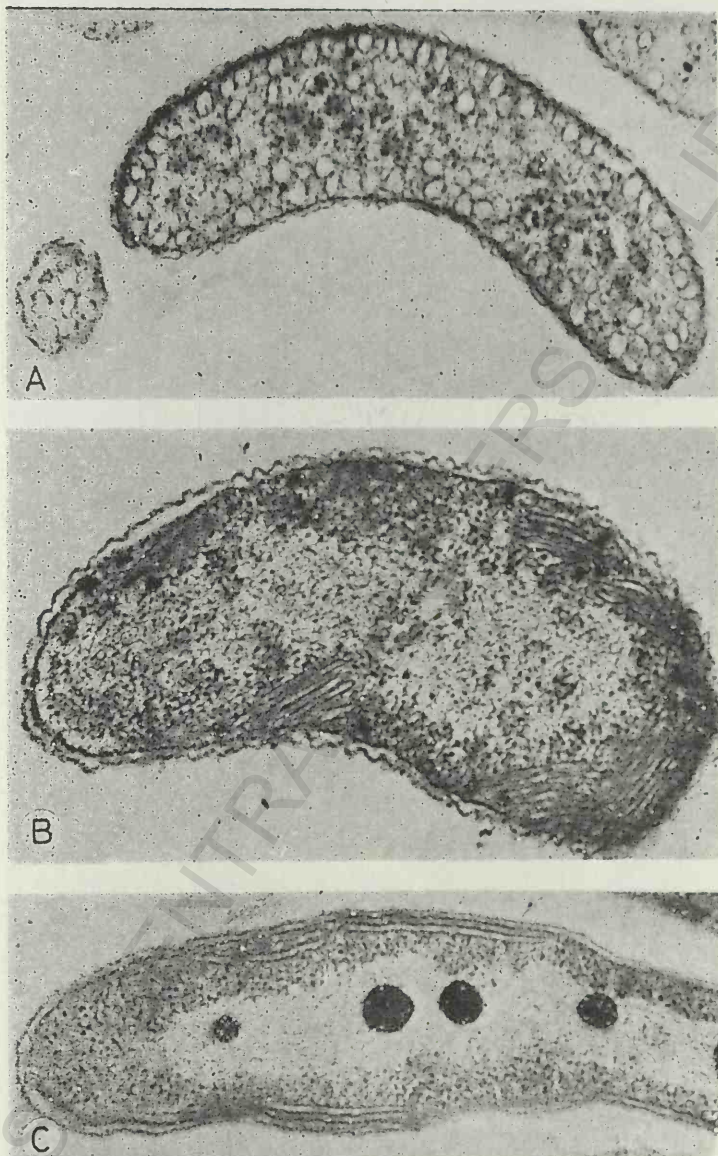
Pl. 62 — *Ectothiorhodospira mobilis* — microelectronografii prezentînd aranjarea obişnuită a membranelor cu lamele paralele (A), cu aranjamente veziculare ale membranelor într-un pachet lamelar (B) şi o secţiune printr-o celulă parţial lizată, prezentînd diferite aranjamente ale membranelor (C) (după Remsen, Watson şi colab., 1968). D. *Rhodopseudomonas viridans*. Secţiune transversală evidenţiind „amprentele" structurilor sub formă de lamele concentrice ale aparatului fotosintetic.



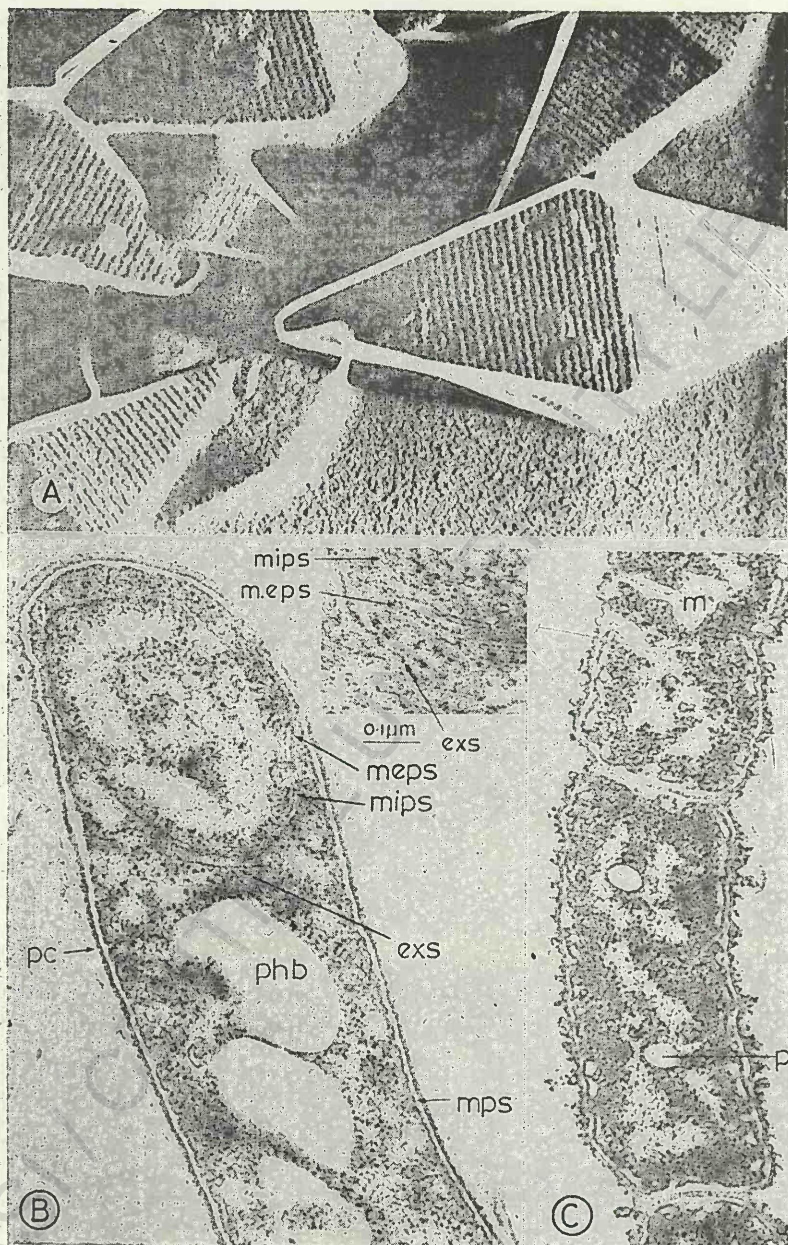


Pl. 63. — **A.** *Chlorobium thiosulfatophilum* : pc — perete celular ; mp — membrana plasmatică ; vch — vezicule de clorobium înconjurate de o membrană electronodensă (mv) adiacentă membranei celulare, dar distinctă de ea ; ex = extensii ale peretelui celular ; m = mezosomi ; pmf = granule de polimetafosfat (după Cohen-Bazire și colab., 1964).

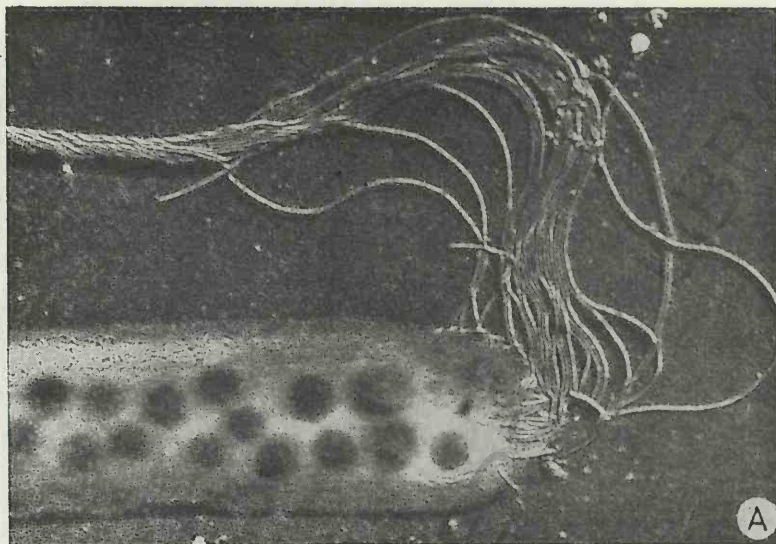
B. *Rhodopseudomonas sphaeroides* — numeroase invaginări veziculare ale membranei plasmatice dispersate în citoplasmă. Pigmenții fotosintetici nu sînt localizați în vezicule, ci în membranele care le formează (după Cohen-Bazire, 1964).

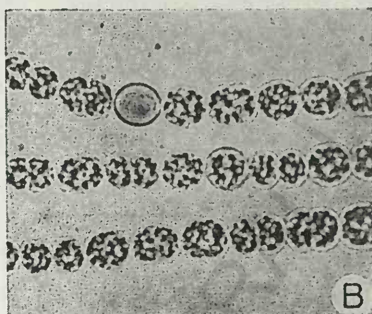


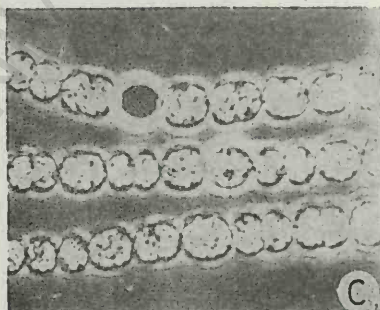
Pl. 64 — Structura fină a aparatului fotosintetic la *Rhodospirillum* sp. A. *R. rubrum* — structură veziculară. B. *R. molischianum* — sistem de structuri lamelare suprapuse. C. *Rhodopseudomonas palustris* — membrane periferice paralele (după Drews şi Tauschel, 1960).

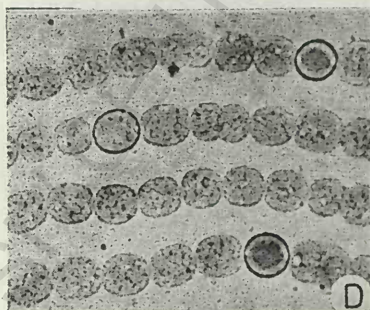


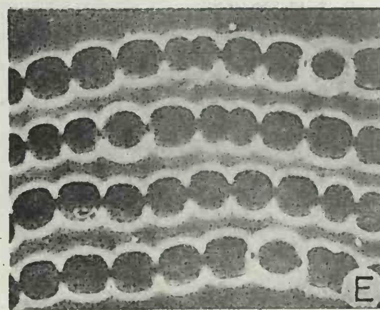
Pl. 65 — **A.** *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* : cristale alcătuite din şiruri paralele de subunităţi sferice (după Vankova şi Kralik, 1966). **B.** *B. cereus* T, în perioada formării sporului, evidenţiind prezenţa incluziunilor de poli-β-hidroxibutirat (phb) : pc — perete celular ; exs — exospor ; mps — membrana citoplasmatică sporangială ; mips — membrana internă şi meps — membrana externă a presporului (după Ohye şi Murrell, 1973). **C.** *Chlorobium thiosulfatophilum* ; secţiune longitudinală printr-un lanţ de celule : p — locul depozitelor de polimetafosfat, al căror conţinut a fost îndepărtat în cursul prelucrării ; m — mezosom asociat cu formarea unui sept transversal.



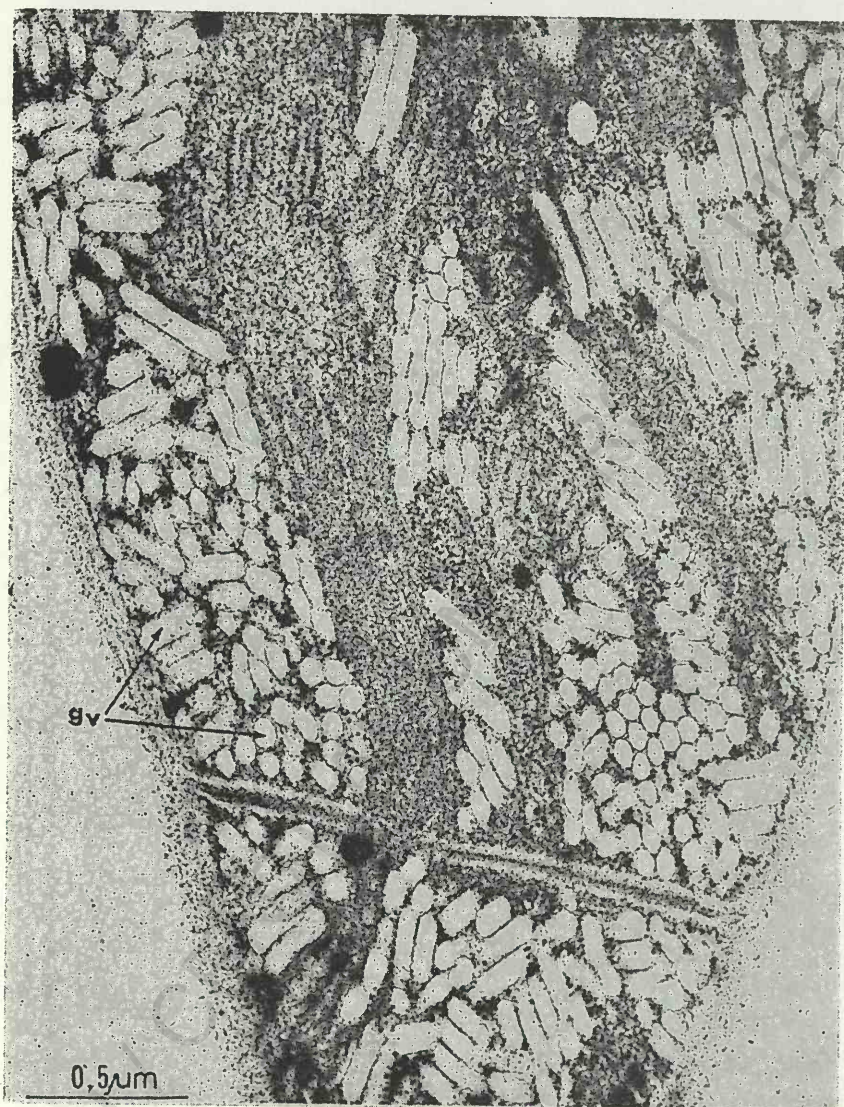




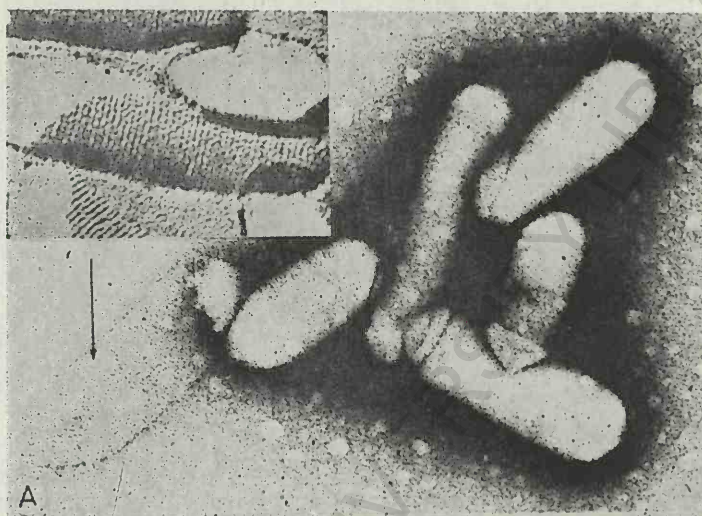


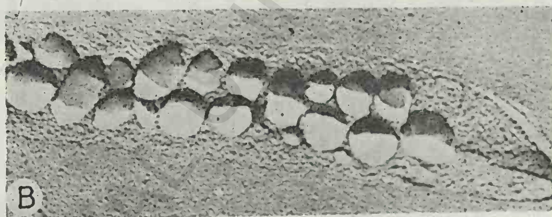


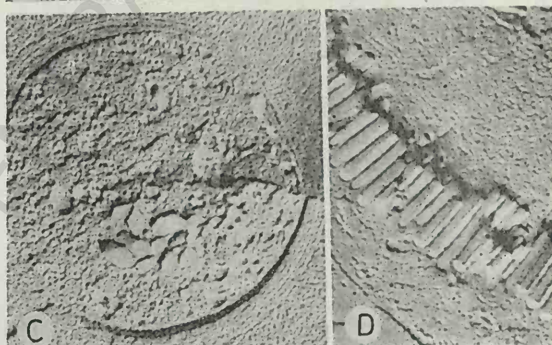
Pl. 66 — Vacuolele la bacterii. **A.** *Halobacterium halobium*, celulă cu vacuole şi un smoc de flageli inseraţi terminal (după Houwink, 1953). **B — E** = *Anabaena flos-aquae* — celule care conţin vacuole cu gaz normale (B şi C) şi după ce au fost turtite şi golite prin presiune (D şi E). Examinare în cîmp clar (B, D) şi în contrast de fază (C, E) (după Walsby, 1972).



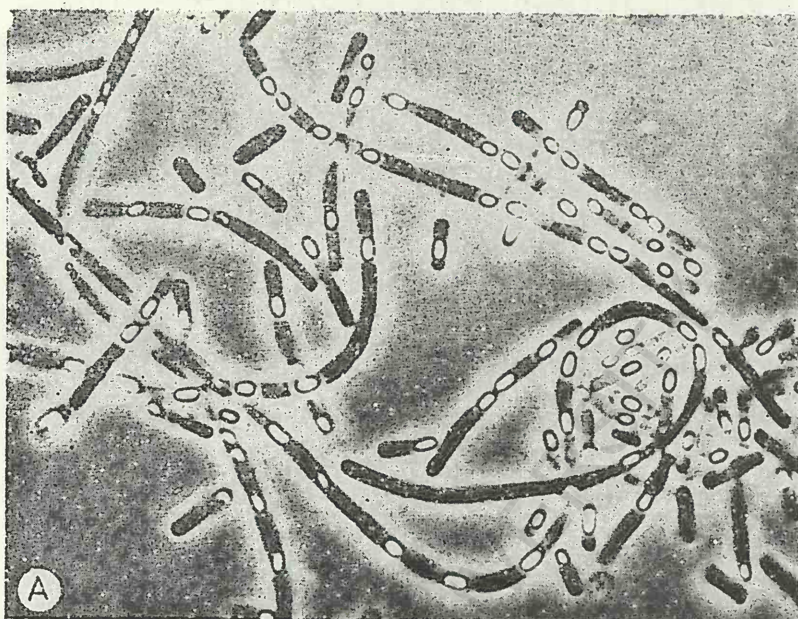
Pl. 67 — *Oscillatoria agardhii* var. *suspensa*. Microelectronografia unei secţiuni ultrafine printr-o regiune a trihomului, evidenţiind vezicule cu gaz (gv) orientate neregulat (după Cohen Bazire şi colab., 1969).

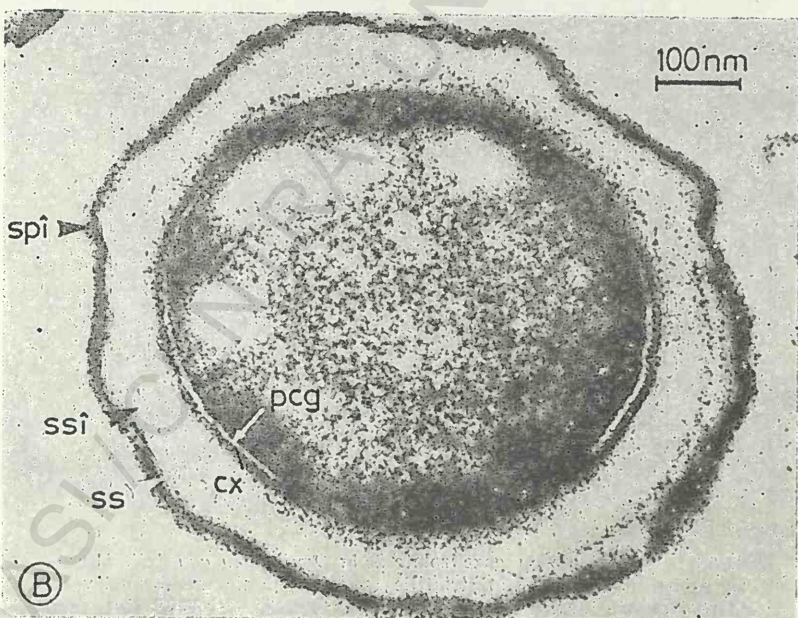




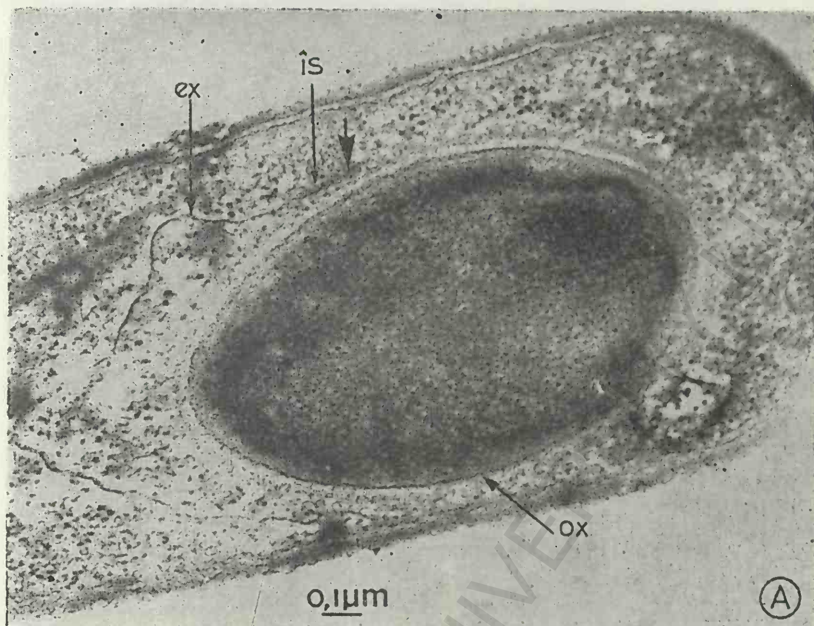


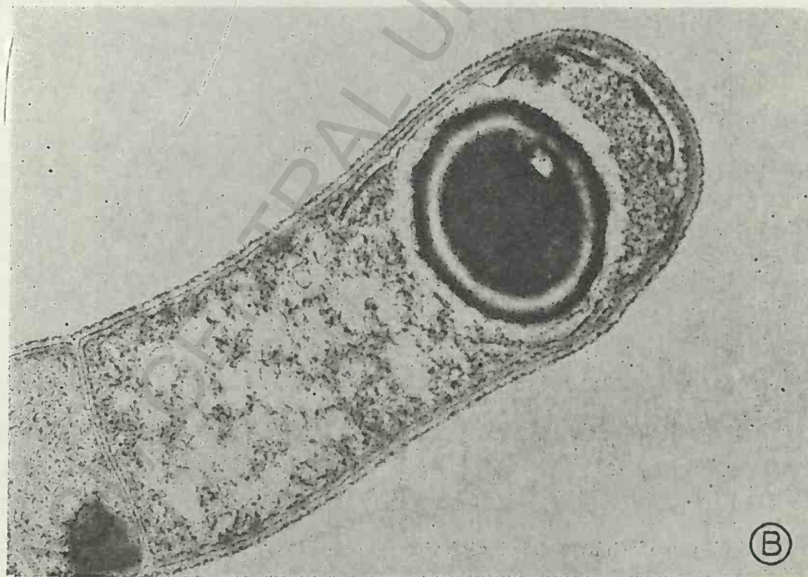
Pl. 68 — **A.** Vezicule cu gaze izolate de la *Oscillatoria agardhii.* Microelectronografie evidenţiind striaţiile transversale ale membranei veziculare. Săgeata indică o veziculă parţial golită; celelalte sînt încă umflate (după Stanier, 1970). **B—D.** Microelectronografii după înghețare-fracturare ale celulelor de *Halobacterium* sp. (B), *Amoebobacter rosea* (C) şi *Anabaena flos-aquae* (D), evidenţiind mărimea şi forma veziculelor cu gaze. (după Walsby, 1972).



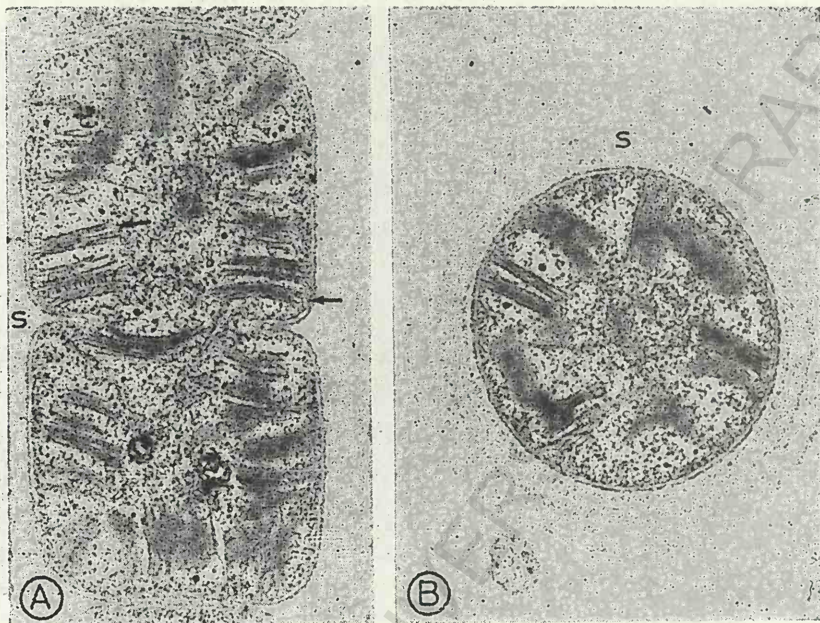


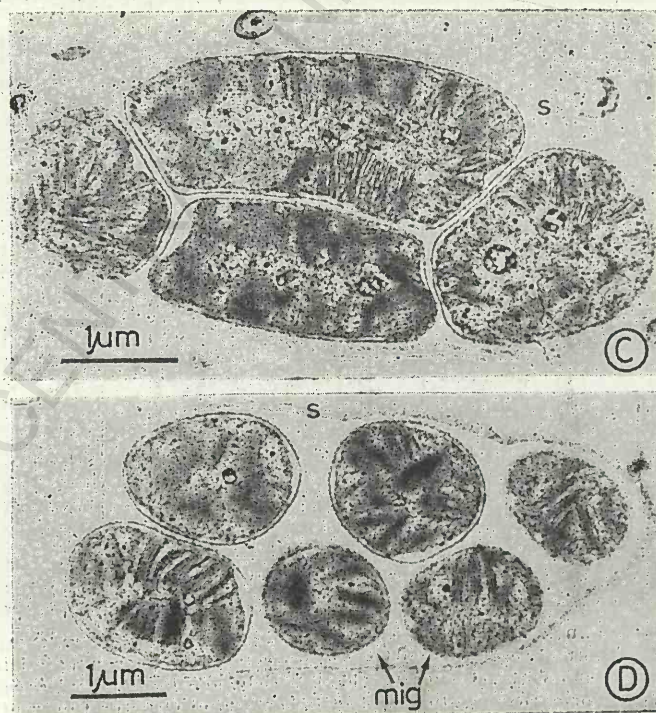
Pl. 69 — Sporul bacterian. **A.** *Bacillus fastidiosus*. Micrografie în contrast de fază, evidenţiind spori şi celule vegetative (după Holt, din Dworkin, 1979). **B.** *Bacillus megaterium*. Microelectronografia unei secţiuni ultrafine printr-un spor: cx — cortex ; pcg — peretele celulei germinative ; spî — stratul peticelor încrucişate ; ssî — stratul de sub înveliş ; ss — stratul cu scobituri (după Aronson şi Fitz-James, 1976).



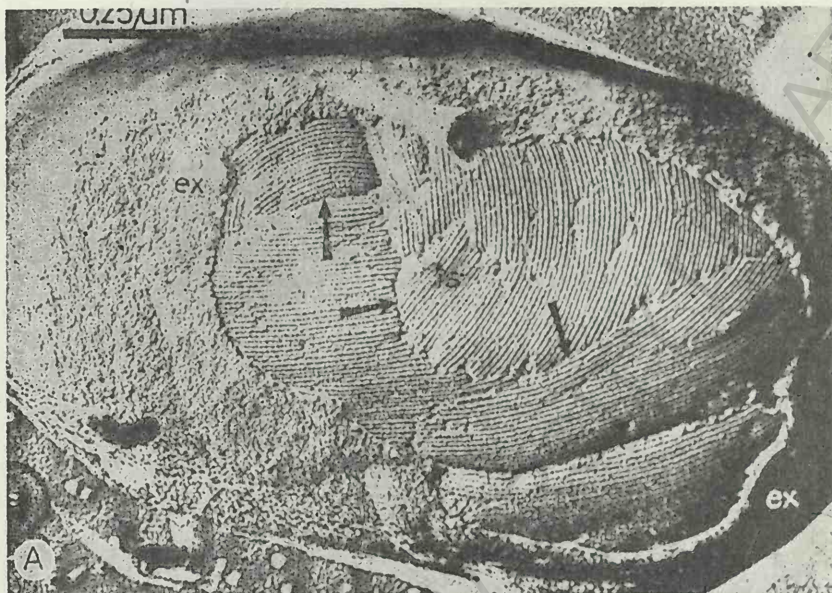


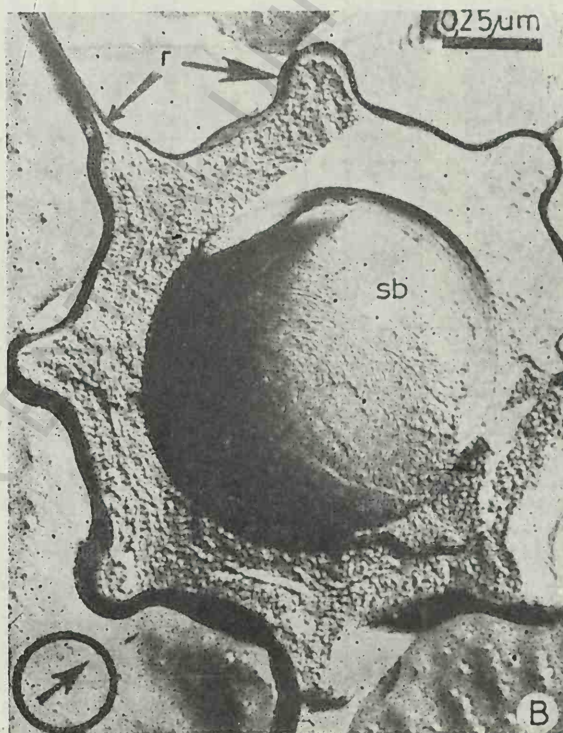
Pl. 70 — A. Stadiu intermediar al sporulării evidenţiind dezvoltarea exosporului (ex) în jurul presporului : cx — cortexul sporaal, îs — zona de depunere a materialului de înveliş sporal (după Ohye şi Murrell, 1973). B. Celulă de *Bacillus sphaericus* conţinînd un endospor aproape matur, evidenţiind exosporul structurat în jurul celulei sporale (după Holt, 1975).



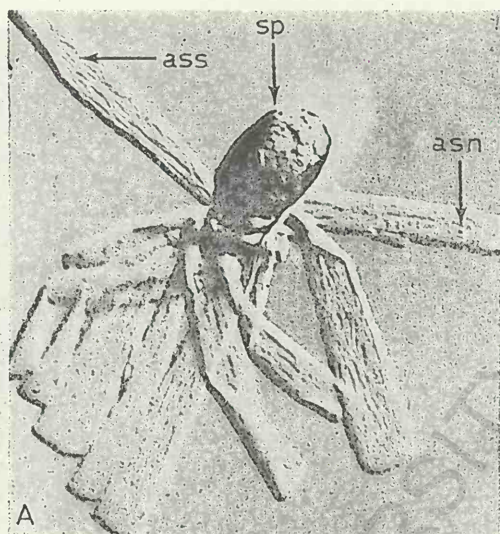


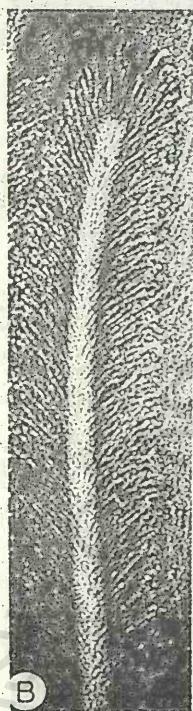
Pl. 71 — *Crenothrix polyspora*. **A.** Secţiune longitudinală printr-o celulă pe cale de diviziune. **B.** Secţiune transversală evidenţiind „teaca" (s) groasă, pericelulară. **C.** Secţiune printr-o teacă umflată conţinînd celule strîns împachetate într-un stadiu anterior formării microgonidiilor. (mig). **D.** Teacă conţinînd gonidii mature (după Volker, Schweisfurth şi Hirsch, 1977).

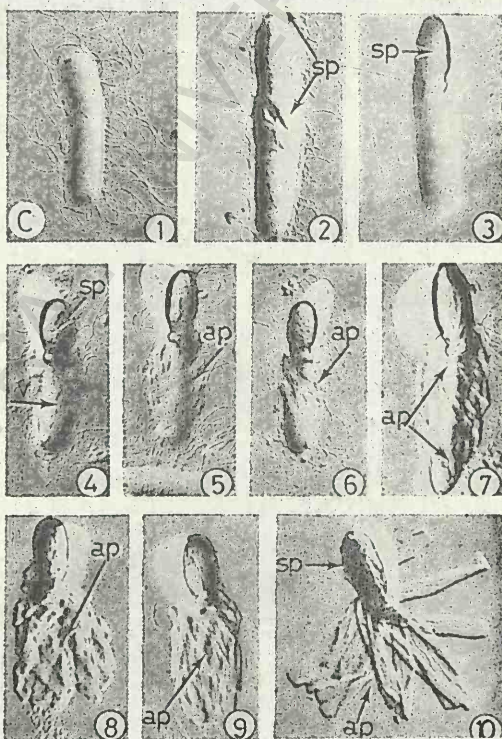




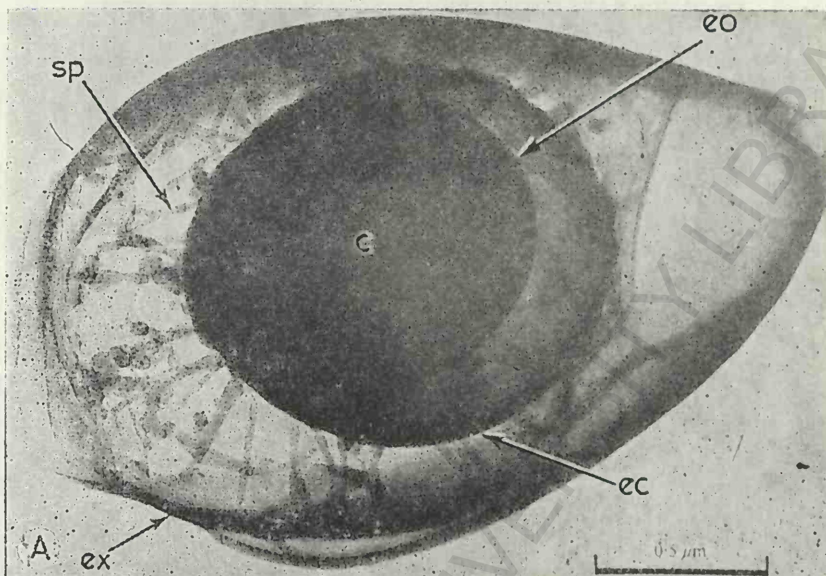
Pl. 72 — Sporul bacterian. A. *Bacillus licheniformis*. Microelectronografie după tehnica de înghețare-fracturare. Se observă învelișurile sporale multistratificate și exosporul, învelișuri sporale (is) și structura exosporului (ex). B. *B. polymyxa*. Microelectronografie — după tehnica de înghețare-fracturare, evidențiind corpul sporal (sb) și crestele învelișului sporal (r) (după Holt și Leadbetter, 1969).

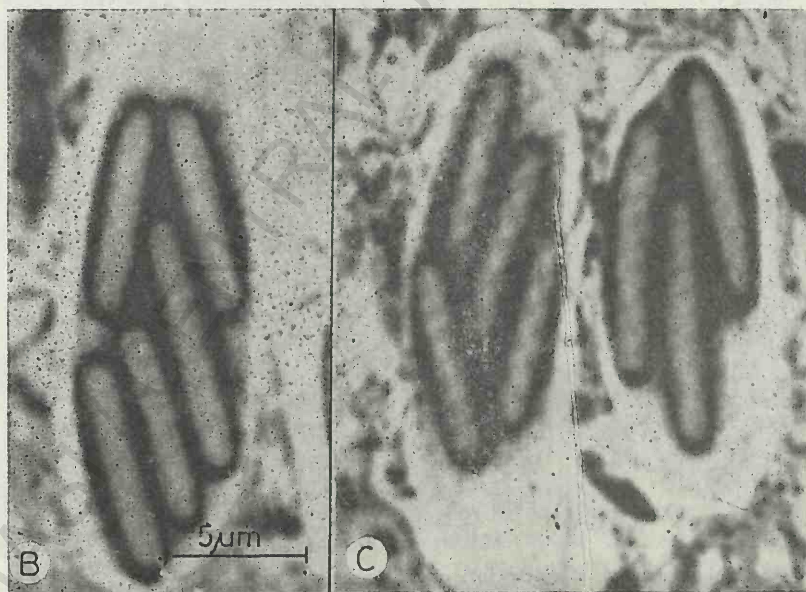




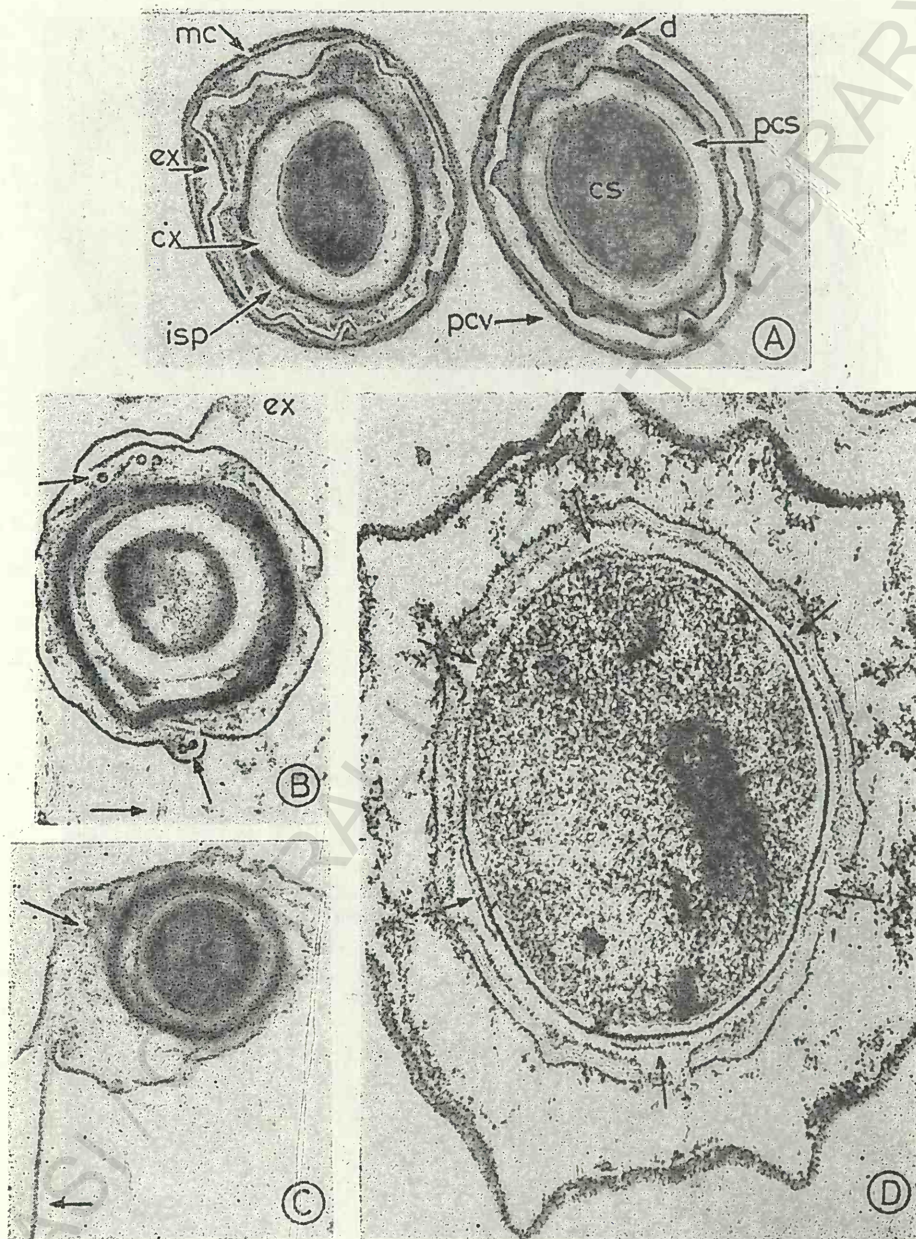


Pl. 73 — Apendicele sporale. A. Spor matur de *Clostridium* (sp) prezentînd apendice sporale cu suprafaţa striată (ass) şi netedă (asn). B. Apendice sporal cu striaţii paralele, inserate oblic pe o nervură centrală (aspect de „pană de pasăre"). C. Etapele succesive ale formării sporului şi apendicelor sporale la *Clostridium* : 1 — celula vegetativă peritrihă ; 2 — începutul formării sporului (sp) ; 3 — sporangiu cu sporul în curs de maturare ; 4 — spor liber, celulă vegetativă (v) în curs de liză şi dezintegrare ; 5, 6 — apariţia apendicelor sporale (ap) ; 7—10 — etape succesive în formarea apendicelor sporale şi dispariţia celulei vegetative (după Rode, Crawford şi Williams, 1967).

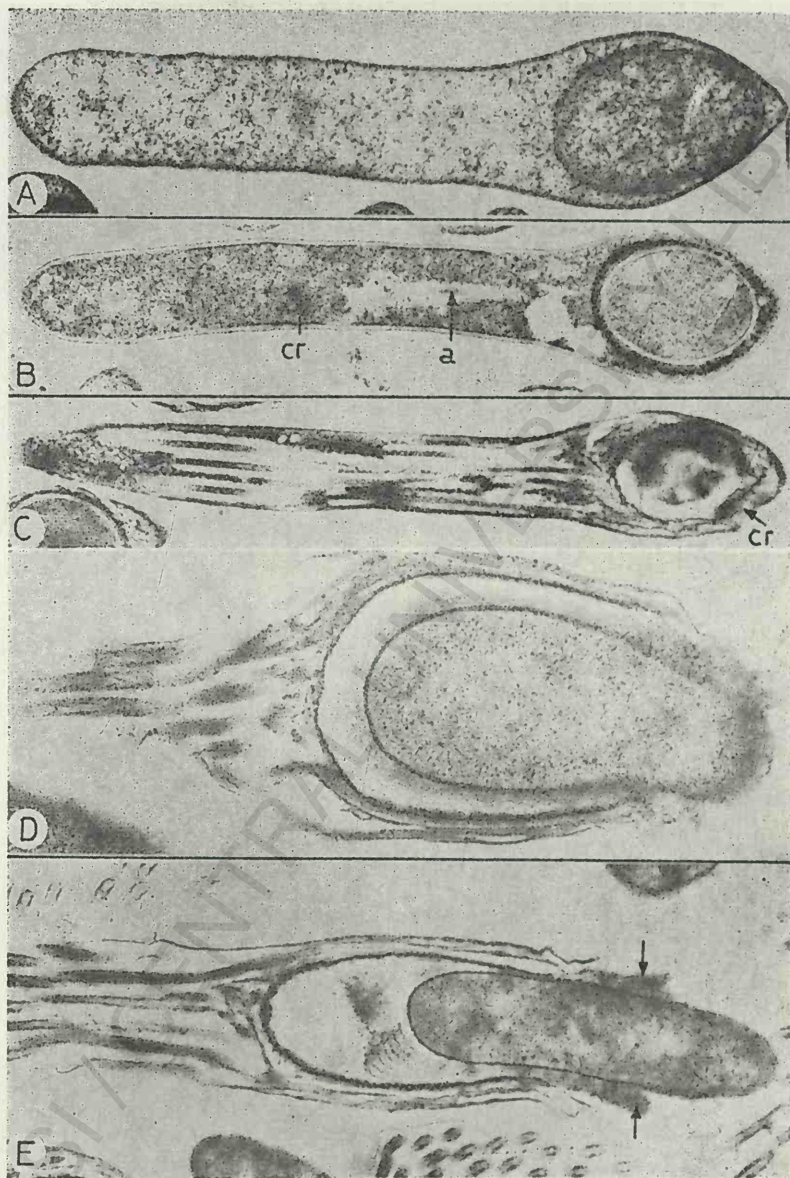




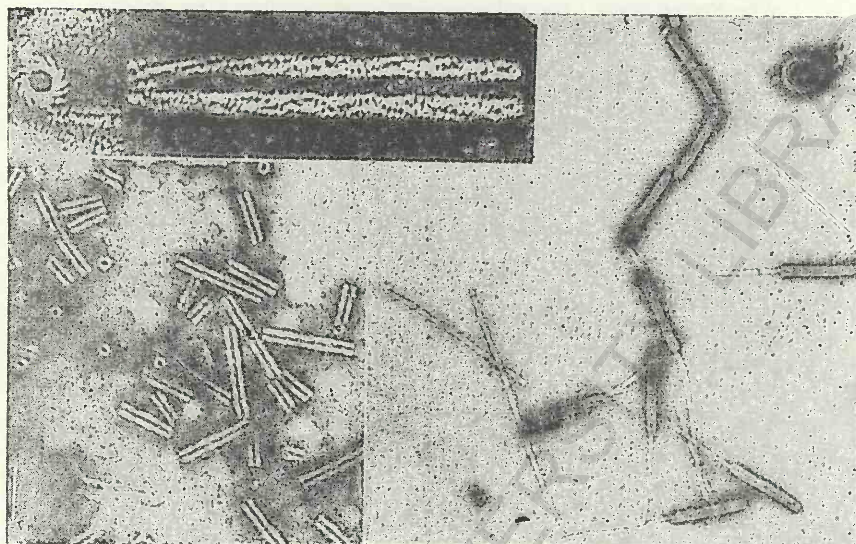
Pl. 74 — Sporul bacterian. A. *Clostridium pasteurianum*— celula sporală prezentînd o zonă centrală (c), electronopacă (eo), acoperită de un înveliş mai puţin dens (ec) este legată de exospor (ex) prin intermediul unor filamente suspensoare (sp) (după Mackey şi Morris, 1972). B. C. *Metabacterium polyspora* — bacterie izolată din cecum de cobai, prezentînd mai mulţi spori acoperiţi de acelaşi înveliş (după Robinow, din Gunsalus, 1960).

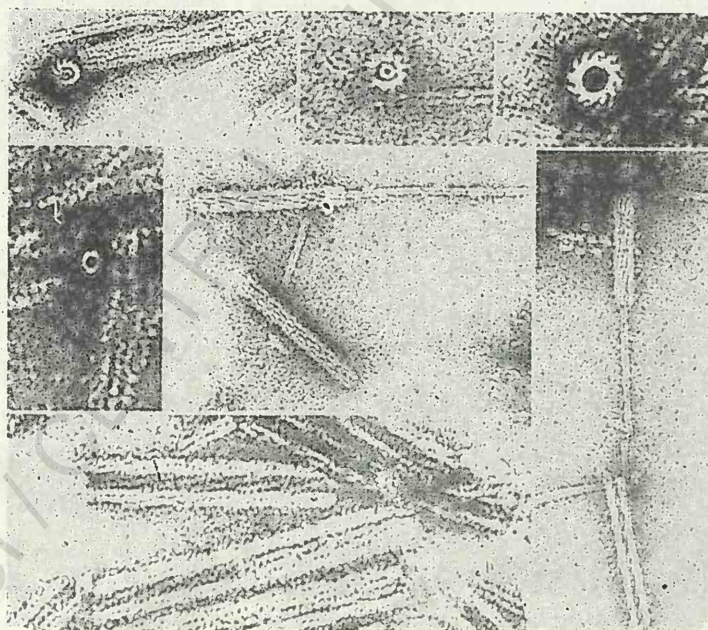


Pl. 75 — Sporul bacterian. **A.** Microelectronografie evidențiind structura internă în fazele finale ale sporogenezei : cs — celula sporală ; pcs — peretele celulei sporale ; cx — cortexul ; isp — învelișul sporal ; ex — exosporul prezentind o deschidere (d) ; mc — membrana plasmatică ; pcv — peretele celulei vegetative. **B.** Spor liber prezentind 6 apendici sporali secționați transversal (marcați cu săgeți). **C.** Un apendice sporal originar din învelișul sporal trece la exterior printr-o breșă a exosporului (după Pope, Yolton și Rode, 1967). **D.** *Bacillus polymyxa.* Spor în stadiul precoce de germinare. Se observă învelișul sporal rupt în mai multe locuri (→) și începutul formării peretelui celular primordial al viitoarei celule vegetative, marcat cu săgeți (după Murray, 1970).

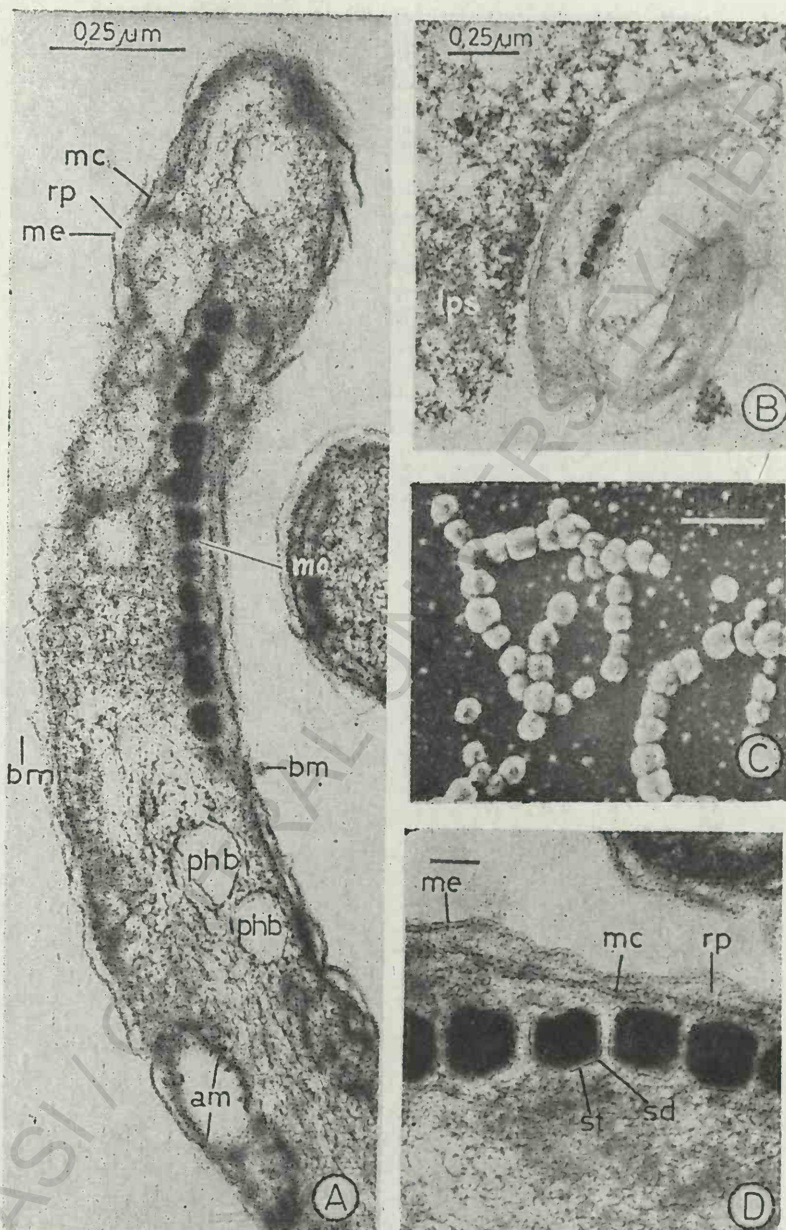


Pl. 76 — Secțiuni longitudinale prin sporangii de *Clostridium cochlearium* în faza de prespor (A), spor imatur (B) și spor matur cu numeroși apendici sporali, lungi, drepți în citoplasma vegetativă (C) : a—apendice sporal ; cr—cristal de incluziune (după Pope și Rode, 1969). D. E. Secțiuni prin spori de *Cl. bifermentans* în curs de germinare. Se observă înlăturarea materialului cortical (săgeți) și constricția celulei vegetative emergente de către învelișurile sporale în timp ce părăsește straturile de înveliș prin polul opus apendicelor sporale (după Samsonoff și colab., 1970).

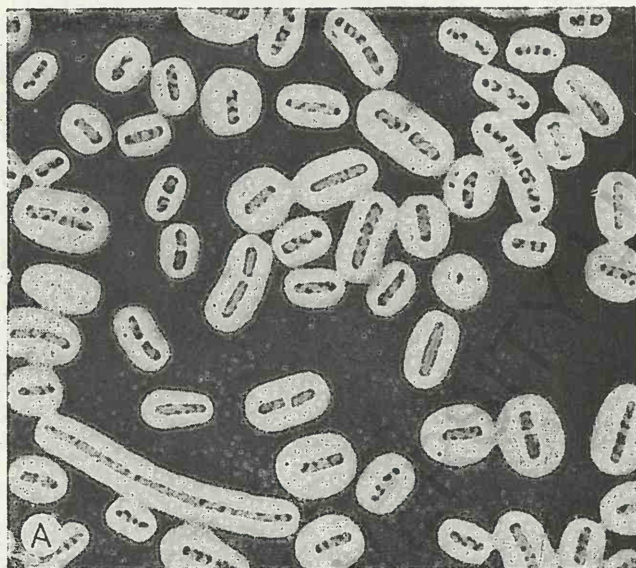


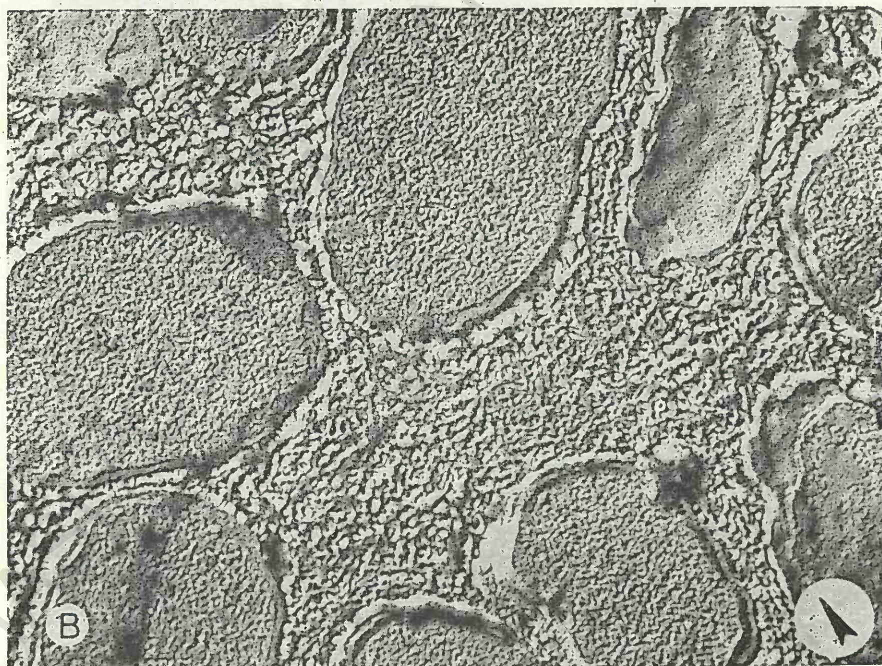


Pl. 77 — Rhapidosomi în formă de bastonaşe tubulare sau de cilindri ca o lumînare cu „fitil". Se observă desenul în benzi helicale ale tecilor goale şi aspectul helical de roată dinţată pe secţiunile transversale (după Reichel şi Lewin, 1967).

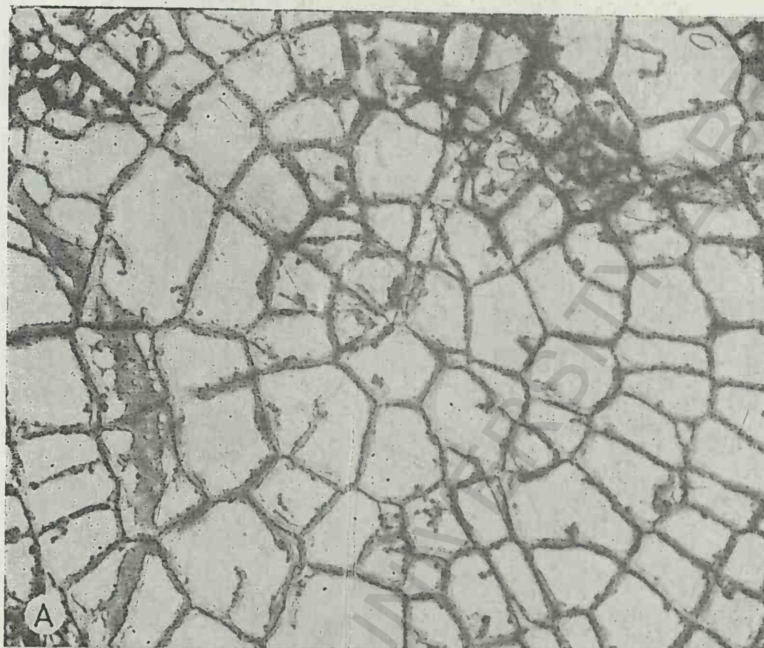


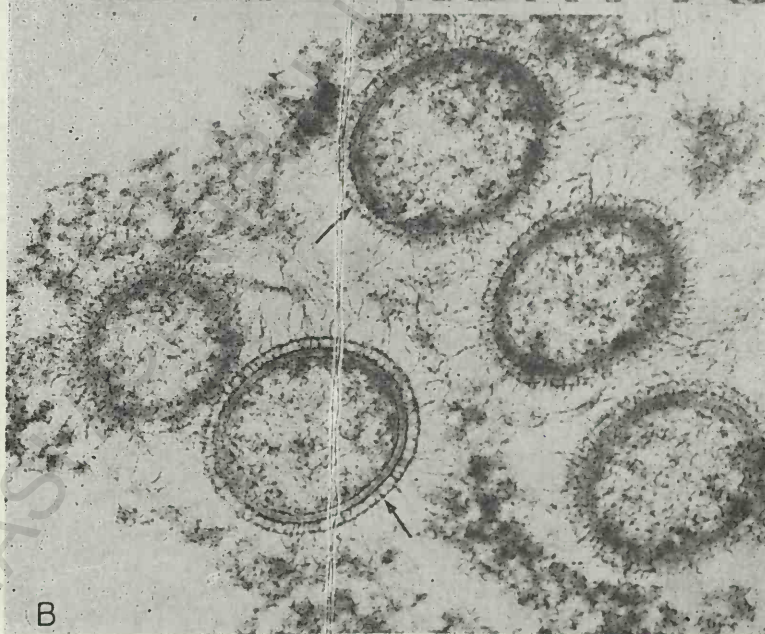
Pl. 78 — *Aquaspirillium.* Microelectronografia pe secţiuni ultrafine a unor celule magnetotactice (A şi B), magnetosomi izolaţi (C) şi detaliile structurii lor (D): me — membrana externă; mc — membrana citoplasmatică; am — anse membranoase; rp — regiune periplasmică; phb — poli-β-hidroxibutirat; lps — lipopolizaharid; st — strat electronotransparent; sd — strat electronodens; bm — bucle membranoase pe suprafaţa celulară (după Balkwill şi Blakemore, 1980).



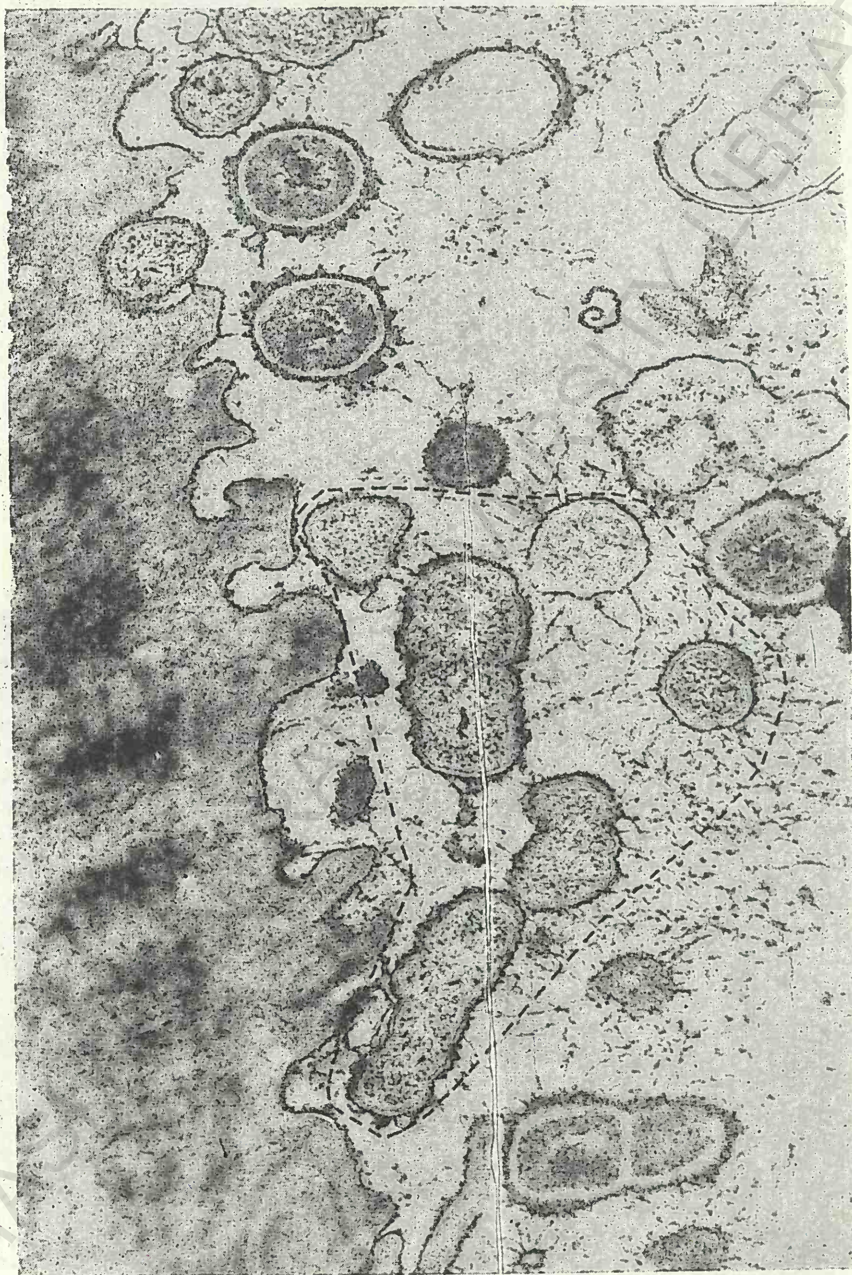


Pl. 79 — A. Capsula bacteriană la *Bacillus megaterium*, evidenţiată prin coloraţia cu tuş de China (Robinow). B. *Enterobacter aerogenes.* Replica evidenţiind structura fibrilară a stratului mucos exopolizaharidic. Microelectronografie—tehnica îngheţare—fracturare (după Springer şi Roth, 1973).

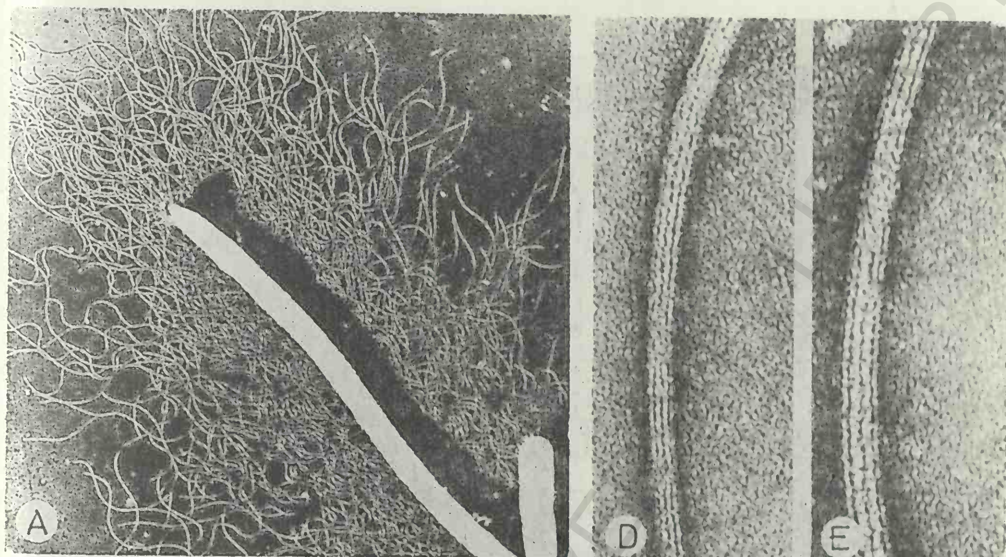


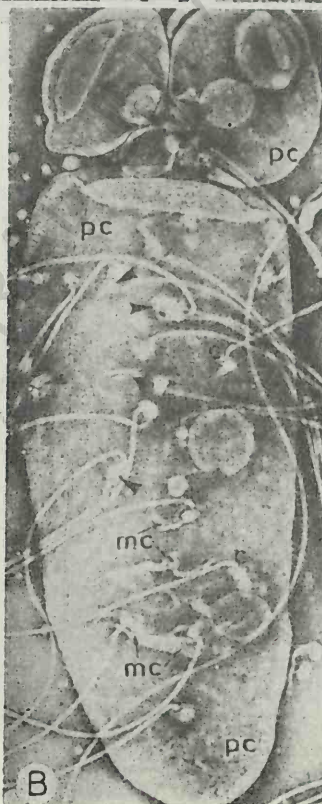


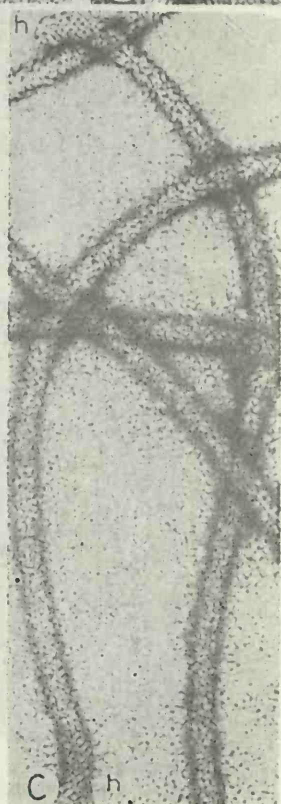
Pl. 80 — A. *Streptococcus bovis* — microelectronografie după tehnica de înghețare —fracturare, evidențiind structura de fibrile intercelulare înalt organizate a polizaharidelor extracelulare (după Cheng și Hironaka, 1976). B. Microelectronografia unei microcolonii bacteriene, evidențiind prezența fibrelor glicocalixului, avînd originea în stratul complex electronodens al suprafeței celulare (după Costerton și Irvin, 1981).



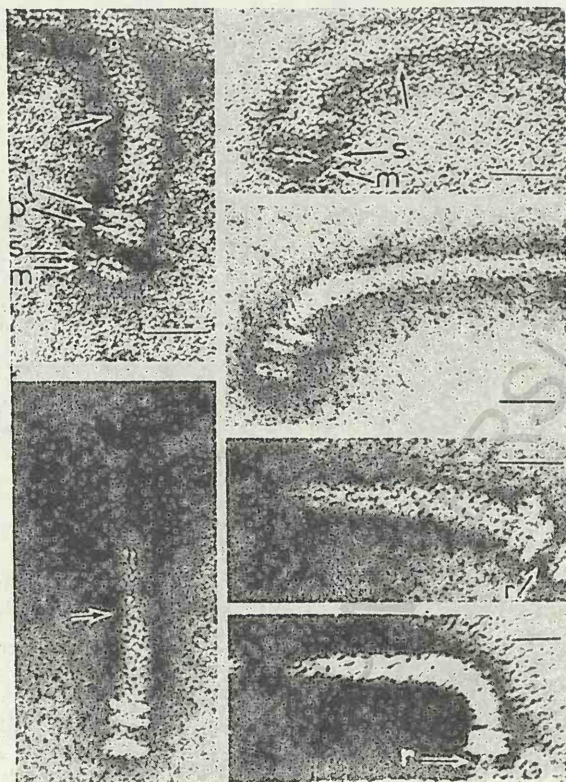
Pl. 81 — Celule bacteriene inclavate în matricea comună și continuă a unui glicocalix fibros, ancorat de epiteliul mucoasei rumenului de bovine. Linia punctată delimitează microcolonia (după Cheng, Irvin și Costerton, 1981).



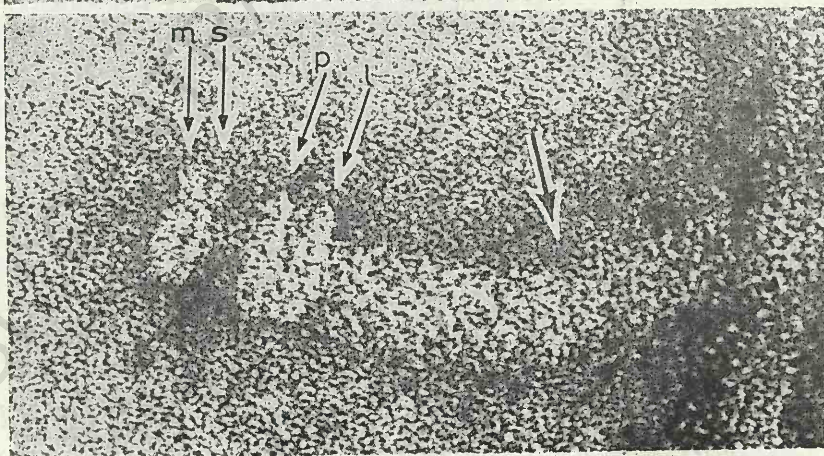


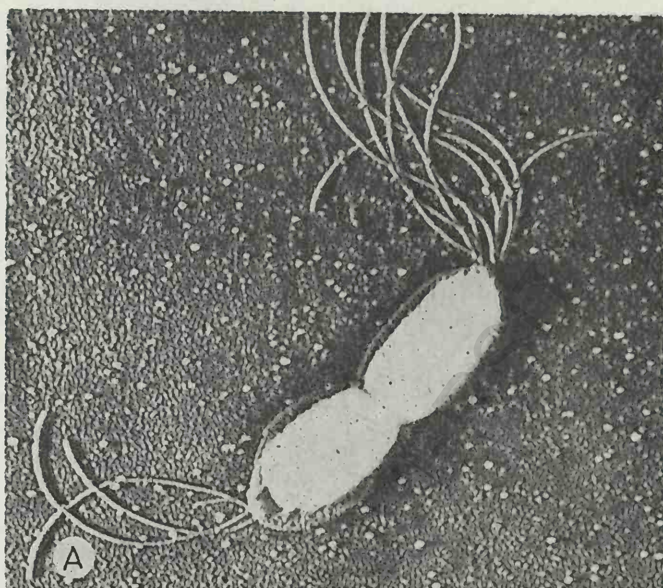


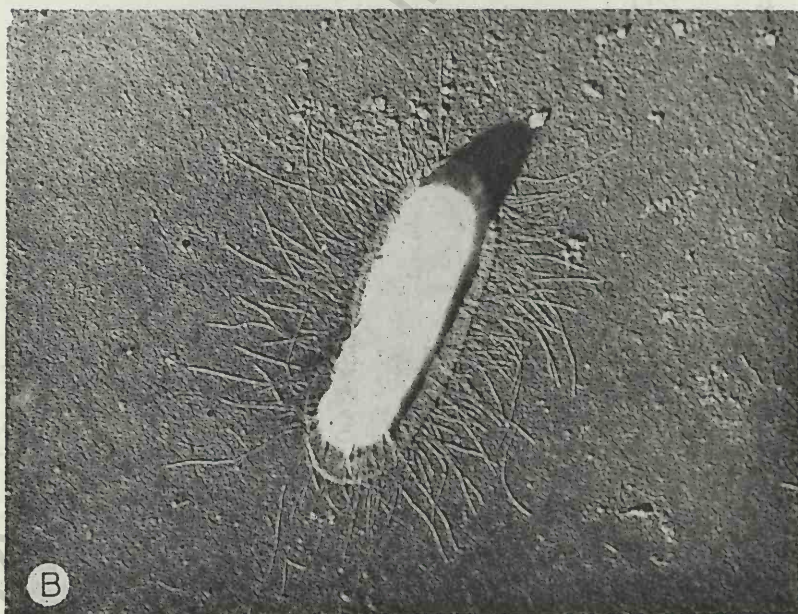
Pl. 82 — Flagelii bacterieni. A. *Proteus vulgaris* — bacterie flagelată peritrihă (microelectronografie după umbrire — Robinow şi Hillier, 1957). B. Celulă bacteriană golită de conţinut pentru a evidenţia legătura intracelulară a flagelului prin intermediul unui corp bazal (marcat cu săgeţi) prevăzut cu un „cîrlig" (c) : pc — perete celular ; mc — fragmente de membrană celulară pliate. C. D. E. Flageli bacterieni izolaţi în stare pură prin îndepărtare mecanică şi centrifugare diferenţială, evidenţiind porţiunea bazală (cîrligul „h") ancorată în celula bacteriană (după Abram şi Löwe, 1966).



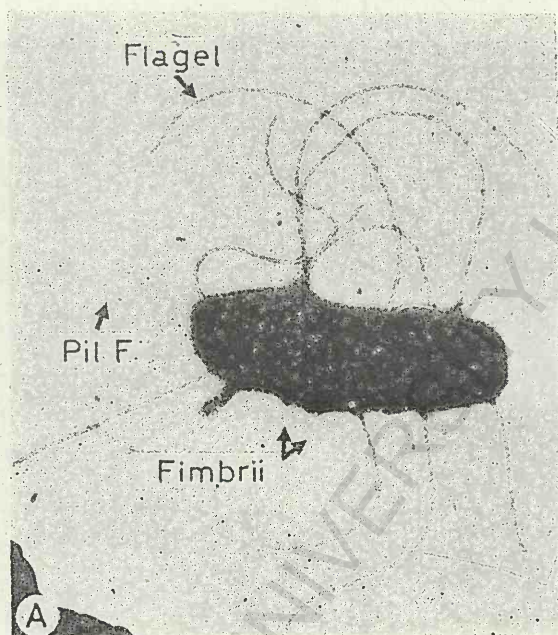
Pl. 83 — Detalii de structură ale corpului bazal (motorul rotativ) al flagelului la *Escherichia coli*, evidențiind discurile l, p, s și m și axul (bastonașul) care le leagă (r) (după De Pamphilis și Adler, 1971).

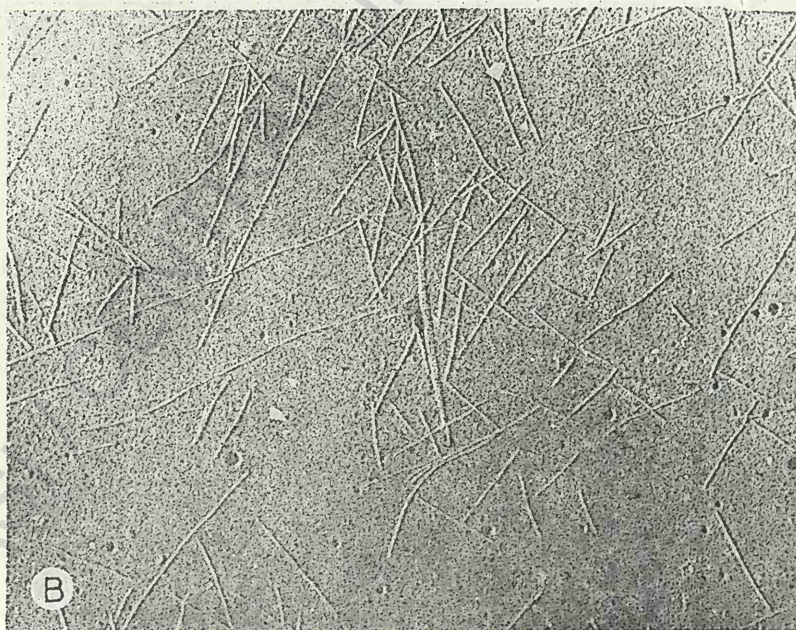






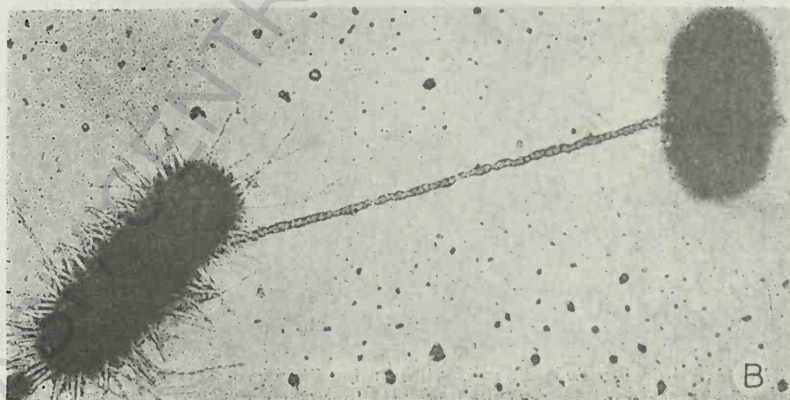
Pl. 84 — A. Bacterie cu flageli bipolari, în curs de diviziune. B. Celulă bacteriană prezentînd numeroase fimbrii (după Scanga, 1959).



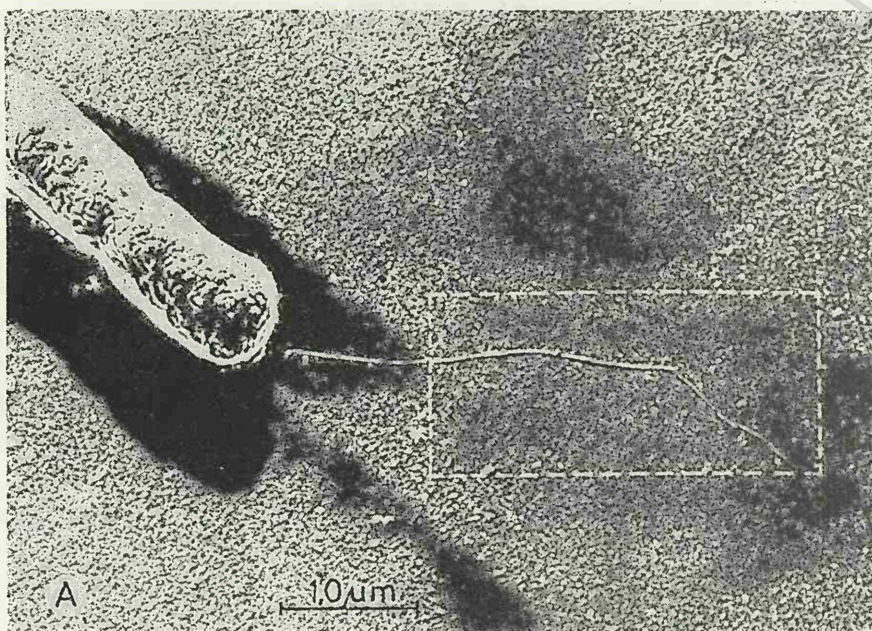


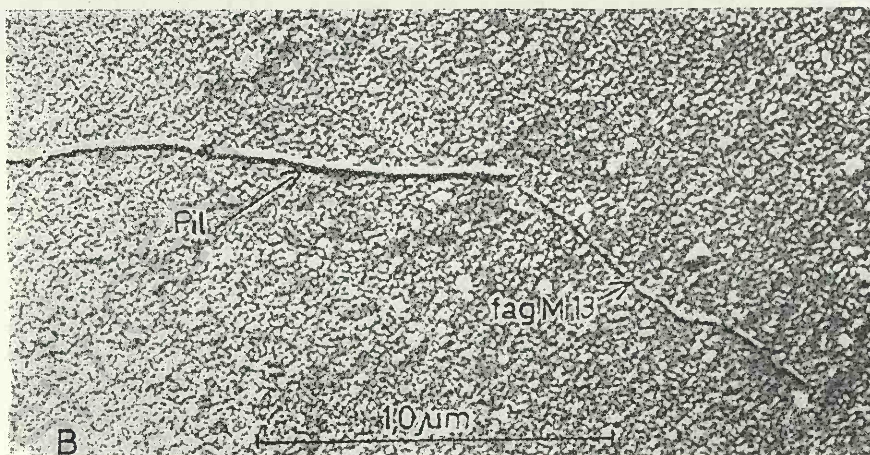
Pl. 85 — **A.** Celulă de *E. coli* prezentînd flageli, fimbrii și un pil de sex (după Meynell, 1968). **B.** Fimbrii de tip I — microelectronografie după umbrire cu metal (după Brinton, 1965).

A

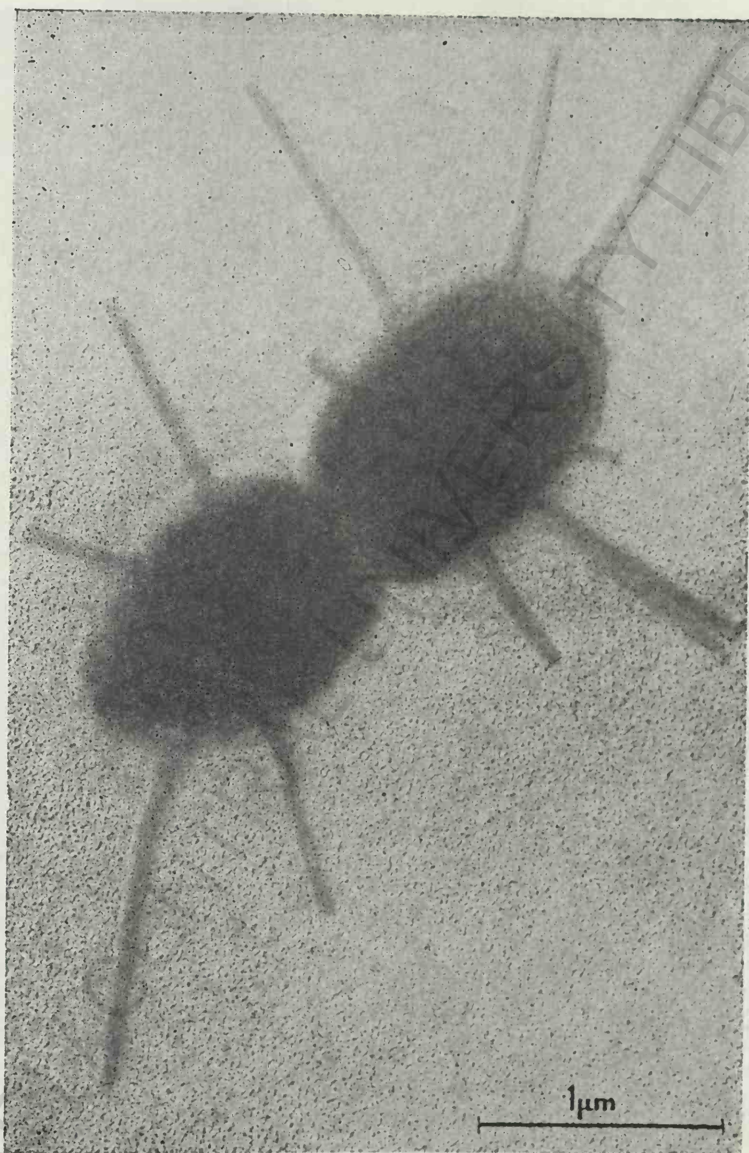


Pl. 86 — A. Agregat de *E. coli*, cuprinzînd celule surprinse în momentul diviziunii şi pe cale de conjugare (celule legate printr-o conexiune filamentoasă de tipul celor descrise în cazul pililor de conjugare). Microelectronografie în scanning (după Scharf 1979). B. Celule de *E. coli* legate prin intermediul unui pil de sex în cursul procesului de conjugare (Brinton 1965).

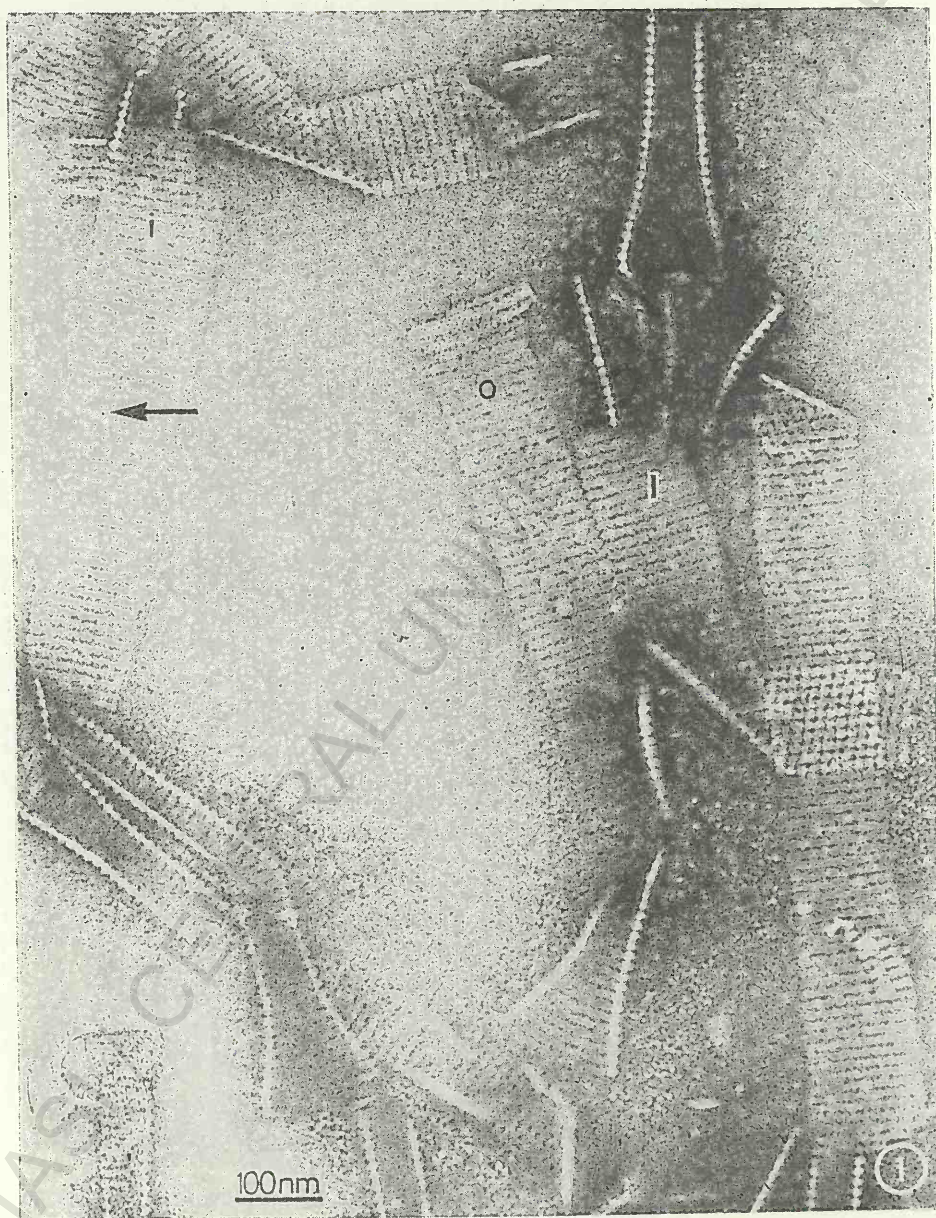




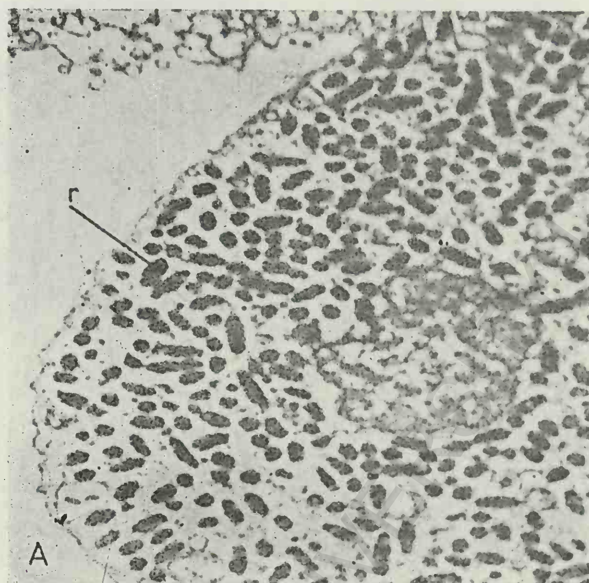
Pl. 87 — A. Pil de sex de la *E. coli,* avînd un fag filamentos M13 fixat la capătul său liber. B. Imaginea mărită a regiunii încadrată în chenar din (A) (după Griffith, din Kornberg, 1980).

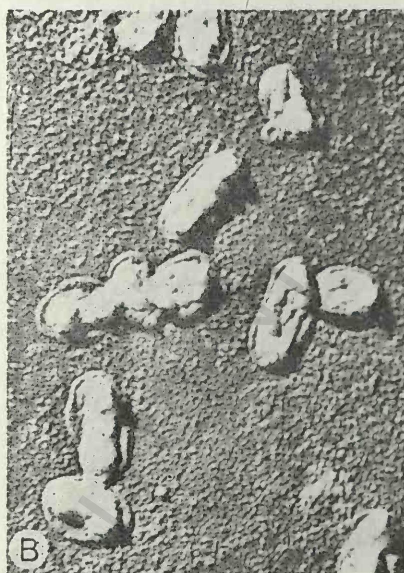


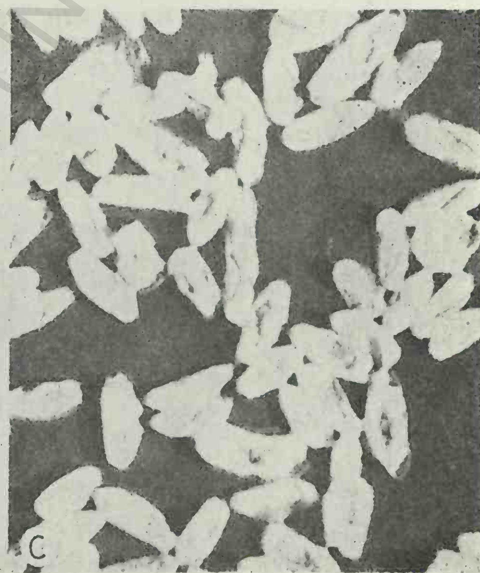
Pl. 88 — Bacterie în curs de diviziune prevăzută cu „spicule bacteriene" (spini) (după Easterbrook, 1976).



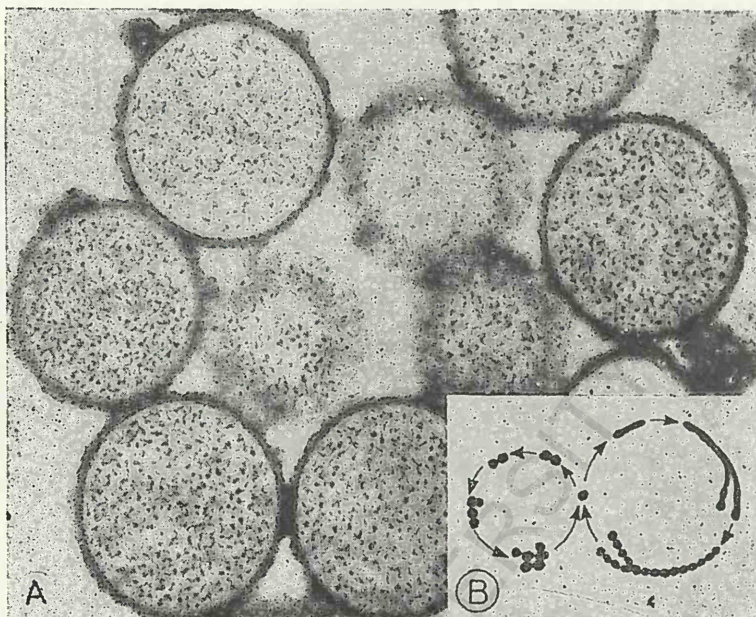
Pl. 89 — „Spini" bacterieni purificaţi. Microelectronografie după coloraţie negativă cu acetat de uranil, evidenţiind aspectul de panglică şi structura fină a suprafeţei interne (i) şi externe (o) (după Easterbrook şi Willison, 1977).

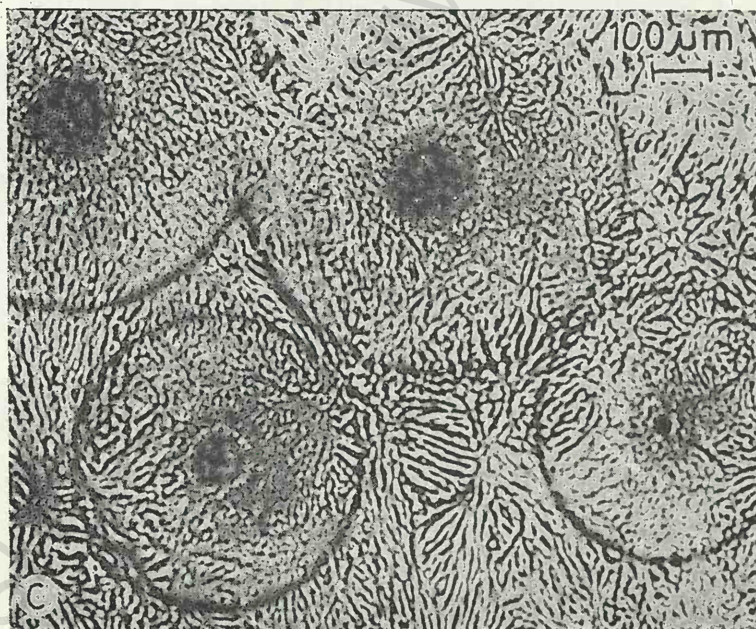




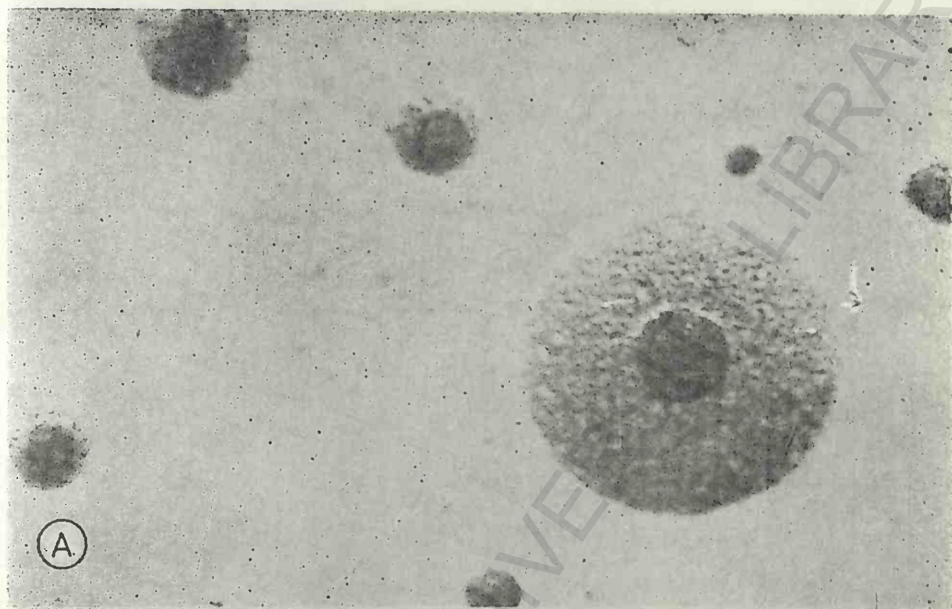


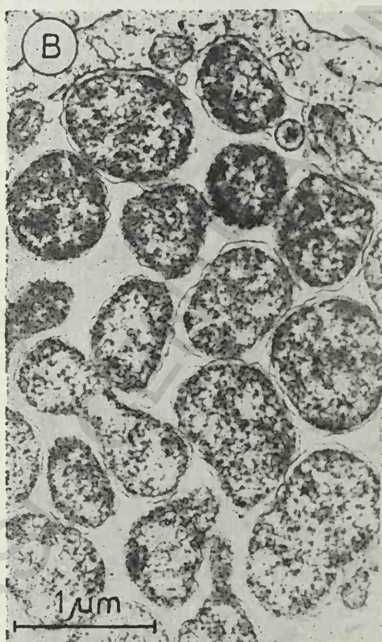
Pl. 90 — A. *Rickettsia prowazekii*. Microelectronografia unei celule de embrion de găină în faza finală a infecției. Întreaga citoplasmă este plină cu celule rickettsiene (r) ; nucleul cu aspect normal nu este infectat (după Wissig, 1960). B. *Rickettsia mooserii*. C. *Coxiella burnetii*. Microelectronografia unei suspensii purificate (după Bolton, 1963).

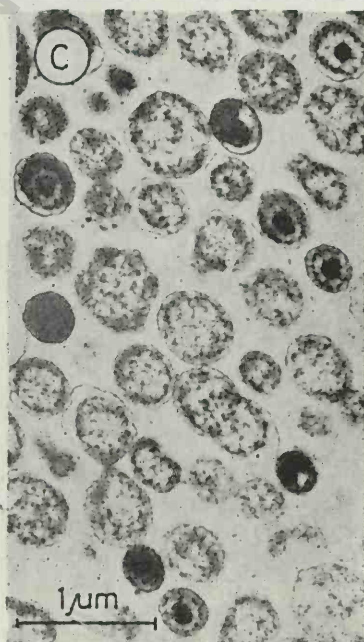




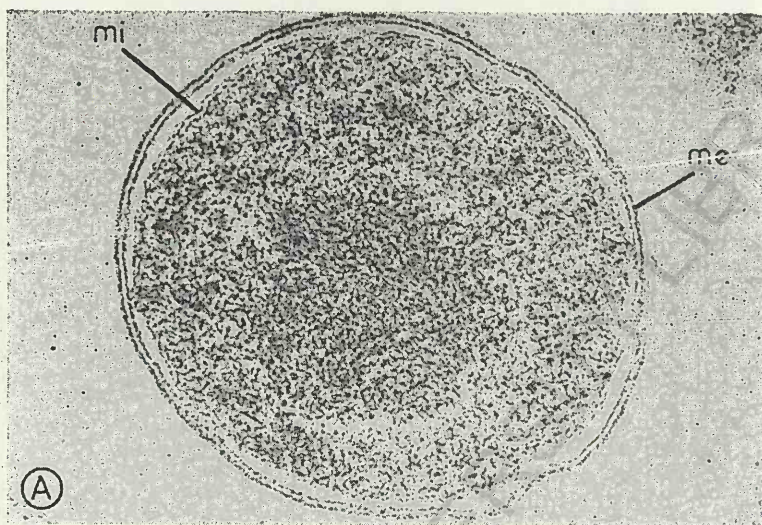
Pl. 91 — A. *Mycoplasma urealyticum*, evidențiind stratul extracelular colorat cu roșu de ruteniu. B. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare : diviziune directă cînd diviziunea citoplasmei este sincronă cu replicarea genomului și formare de filamente multinucleare, urmată de diviziune prin constricție cînd replicarea ADN se face mai repede decît diviziunea citoplasmei (după Robertson, 1978). C. *Mycoplasma pulmonis* — colonii bifazice cu dezvoltare pronunțată a unei pelicule plisate pe suprafața aceluiași mediu — fenomenul „film and spot" — (peliculă și pată) (după Freundt, 1971).

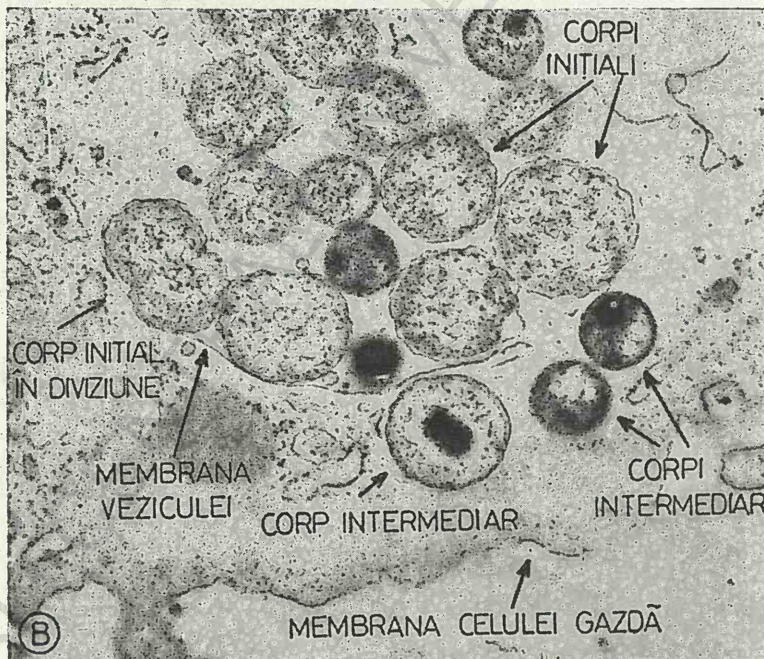




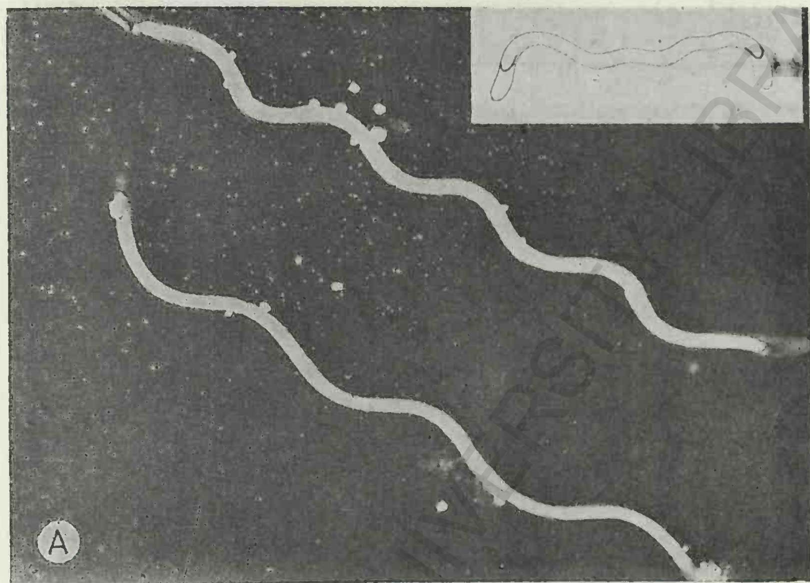


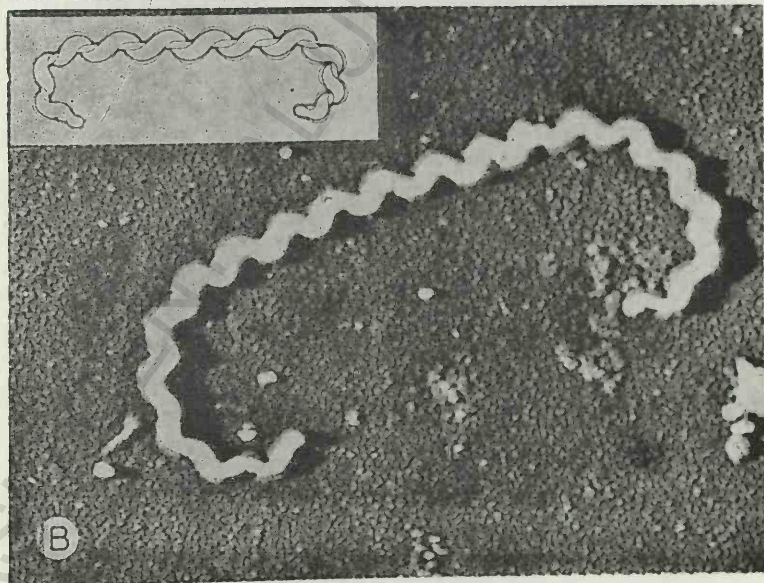
Pl. 92 — A. *Mycoplasma orale*. Colonii bifazice pe agar — ser de cal, cu aspect tipic de „ouă ochiuri" (după Freundt, 1971). B. C. *Chlamydia psittaci*. Ciclul de dezvoltare în celule L — microelectronografii : B, la 20 de ore după infecţie ; C, la 30 de ore după infecţie (după Becker, 1978).





Pl. 93 — **A.** *Chlamydia trachomatis* — corp elementar, secțiune ultrafină: me — membrana externă trilaminară; mi — membrana internă citoplasmatică (după Schachter și Caldwell, 1980). **B.** *Chlamydia psittaci* — microelectronografie, secțiune ultrafină printr-o microcolonie, în citoplasma unei celule, după ruperea membranei. Se observă structura multilaminată a peretelui corpilor elementari și membrana dublă care acoperă corpii inițiali și intermediari (după Cutlip, 1970).



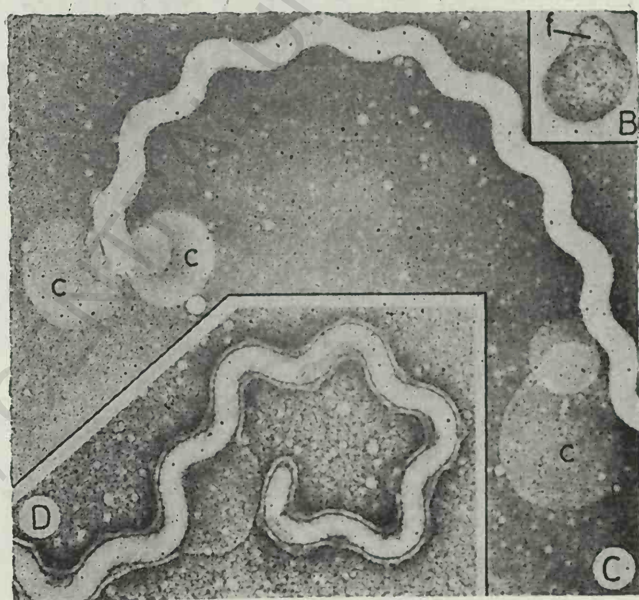


Pl. 94 — A. *Trichospira buccalis*. Saprofit din mucoasa orală, acoperită de o membrană subţire prelungită la cele două extremităţi, formînd două capişoane goale. B. *Leptospira icterohaemorrhagiae*. De remarcat corespondenţele dintre imaginile electronice şi scheme (din Scanga, 1959).



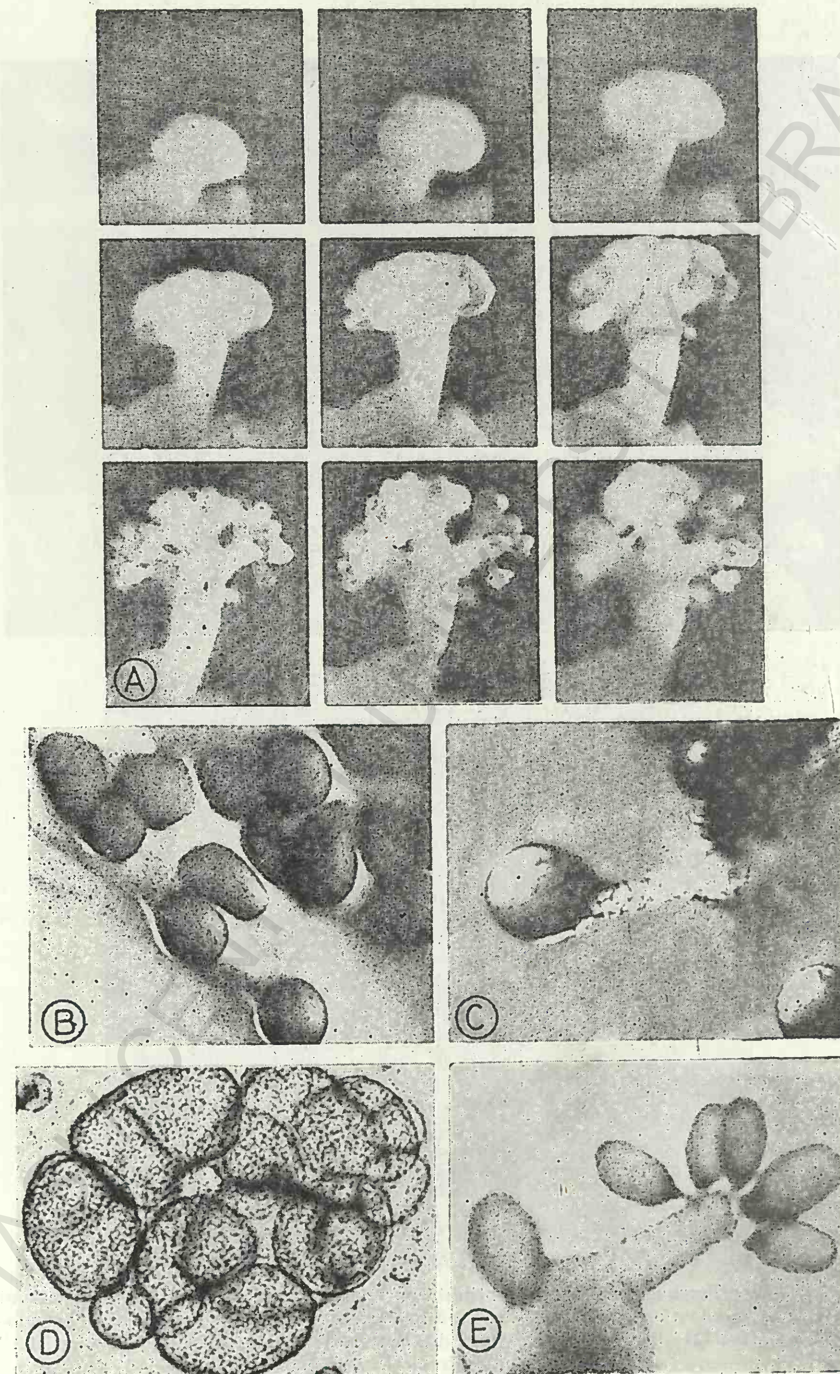
Pl. 95 — *Treponema Reiter*. Microelectronografie evidențiind fibrilele axiale sub forma unor filamente legate de una din extremitățile celulei (după Pillot 1965).





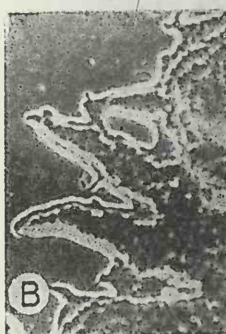
Pl. 96 — **A.** *Treponema* saprofită obținută prin cultivare, avînd o regiune a corpului lizată. Se observă o „cristă" subțire care se destramă ușor, dînd naștere la pseudoflageli; „flagelul" lung evident la una din extremități este o prelungire a „cristei" (după Babudieri, 1959).

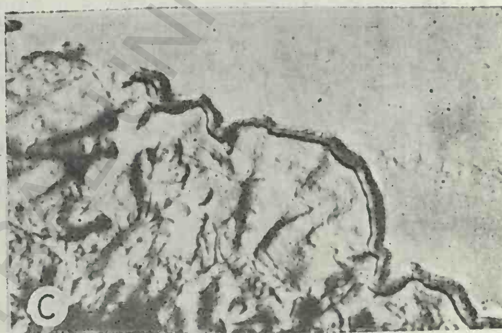
B. Secțiune transversală prin *Borrelia hispanica*, evidențiind localizarea fibrilelor (f). **C. D.** *Leptospira icterohemorrhagiae*: formațiunile rotunde (c) sînt artefacte derivate din înveliș, iar în D se observă axostilul (după Pillot, 1965).

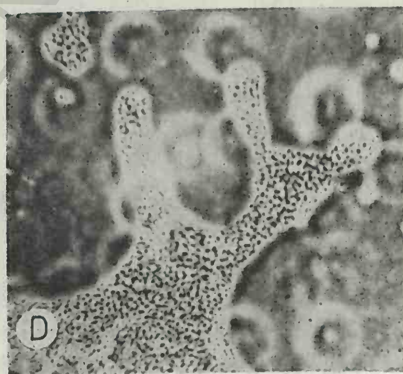


Pl. 97 — Corpi fructiferi ai mai multor specii de mixobacterii. A. Stadii succesive în dezvoltarea corpilor fructiferi complecşi, ramificaţi la *Chondromyces* (după Bonner, 1952). B. *Polyangium fuscum.* C. *Podangium lichenicolum.* D. *Sorangium sp.* E. *Stigmatella aurantiaca* (după Dworkin şi Reichenbach, 1966).

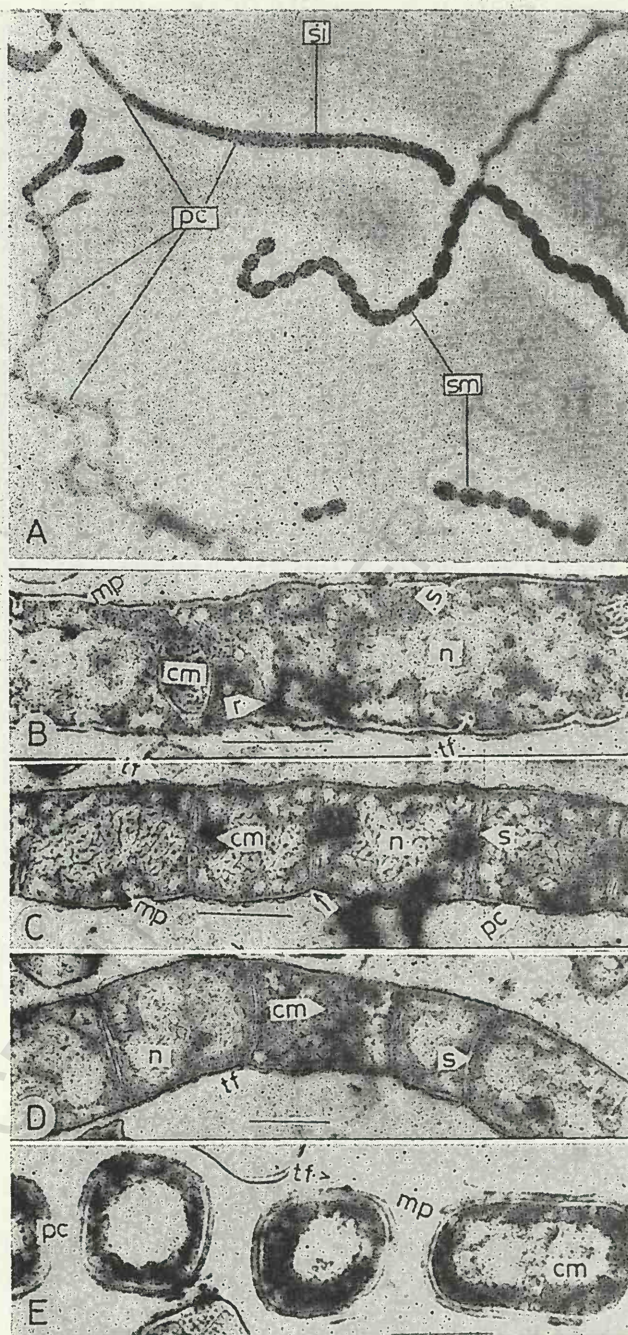




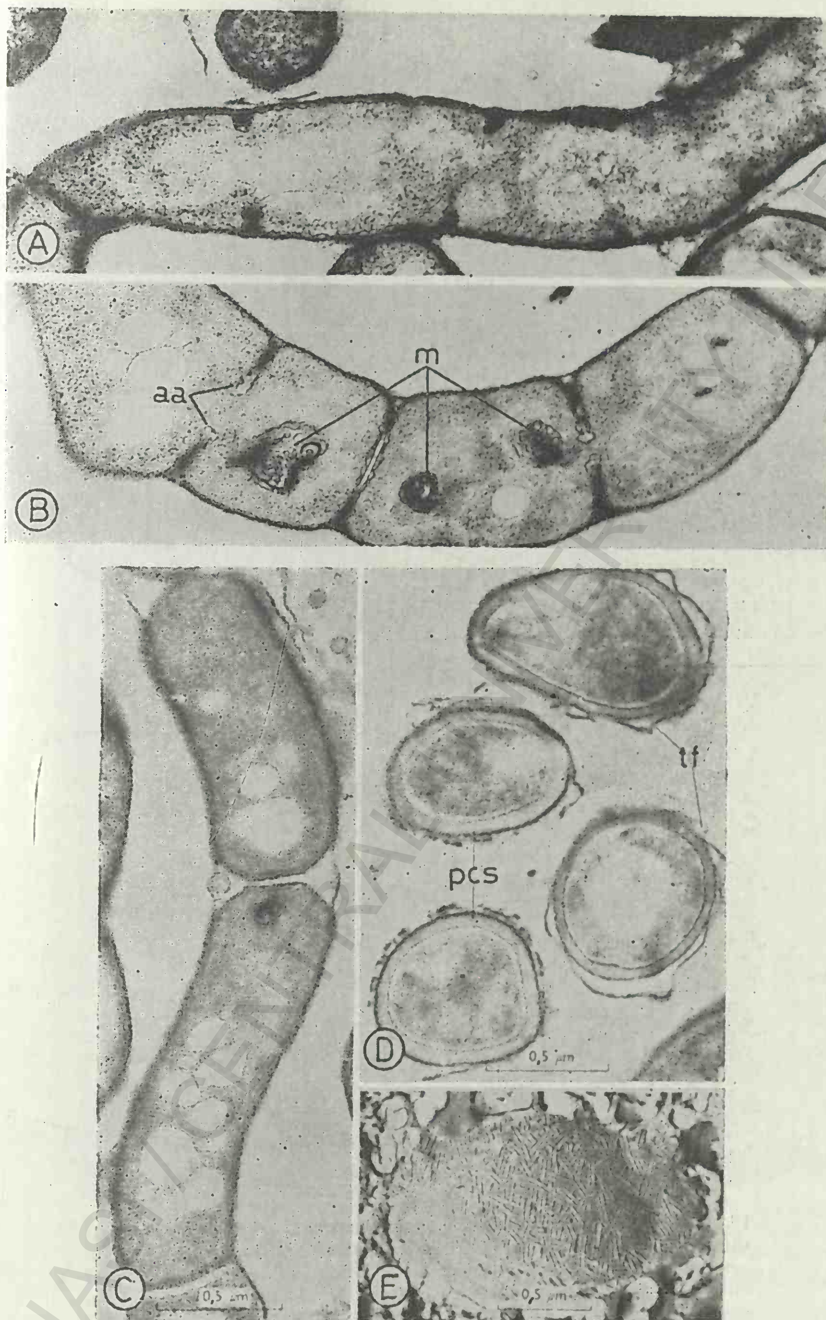




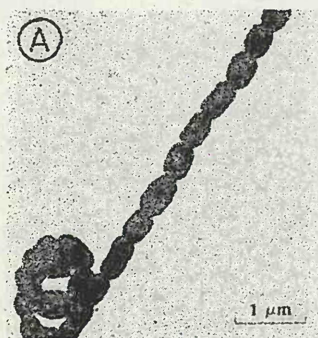
Pl. 98 — *Myxobacteria*. A. Secțiune printr-un chist cu mixospori acoperiți de o capsulă fibroasă, ușor deformați, care conțin incluziuni granulare (g), electrontranslucide (după Voelz și Reichenbach, 1969). B. Margine de colonie roitoare de *Polyangium*. C. Margine ondulată în valuri la *Podangium lichenicolum*. D. *Zoogloea ramigera*, grupare de celule cu prelungiri în formă de deget (contrast de fază, după Freidman 1969).

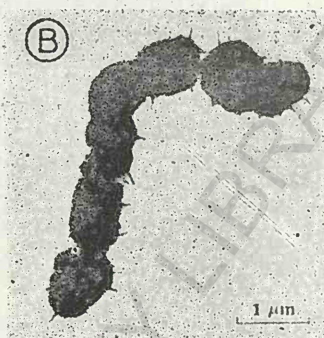


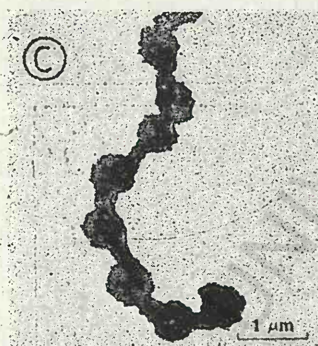
Pl. 99 — A. *Streptomyces coelicolor* : pc — pereţi celulari transversali ; si — spori imaturi ; sm—lanţ helical de spori maturi (după Chater şi Hopwood, 1973). B—E. *Streptomyces venezuelae*. Microelectronografii pe secţiuni ultrafine, evidenţiind structura internă : pc — perete celular ; tf — teacă fibroasă ; n — zonă electronotransparentă conţinînd fibrilele electronodense ale materialului nuclear ; cm — corp membranos ; mp — membrană plasmatică ; r — ribosom ; s — sept transversal (după Bradley şi Ritzi, 1968).

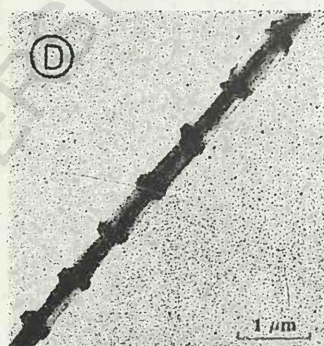


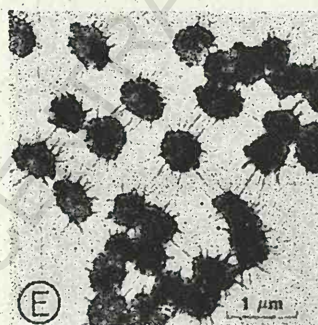
Pl. 100 — *Streptomyces coelicolor.* A. B. Microelectronografii pe secţiuni ultrafine ale unui miceliu aerian în faza precoce de sporulare prin septare (A), evidenţiind dezvoltarea sincronă a septurilor şi în stadiul tardiv de sporulare prin septare (B): aa — inel de septare pe cale de creştere; m — mezosom (după Chater şi Hopwood, 1973). C. D. E. Microelectronografii; C. Secţiune prin celule într-un stadiu tardiv de sporulare, în care sporii sînt conectaţi numai printr-o mică interfaţă şi teaca fibroasă; peretele a început să se îngroaşe. D. Secţiune prin spori maturi: pcs — perete celular gros; tf — teacă fibroasă. E. Suprafaţa sporului prezentînd desenul structurii în perechi de „bastonaşe" (după Chater şi Hopwood, 1973).

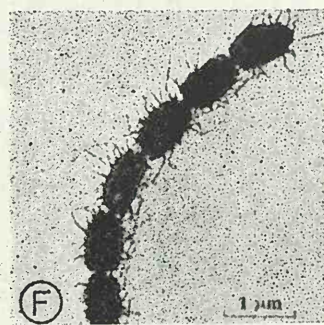




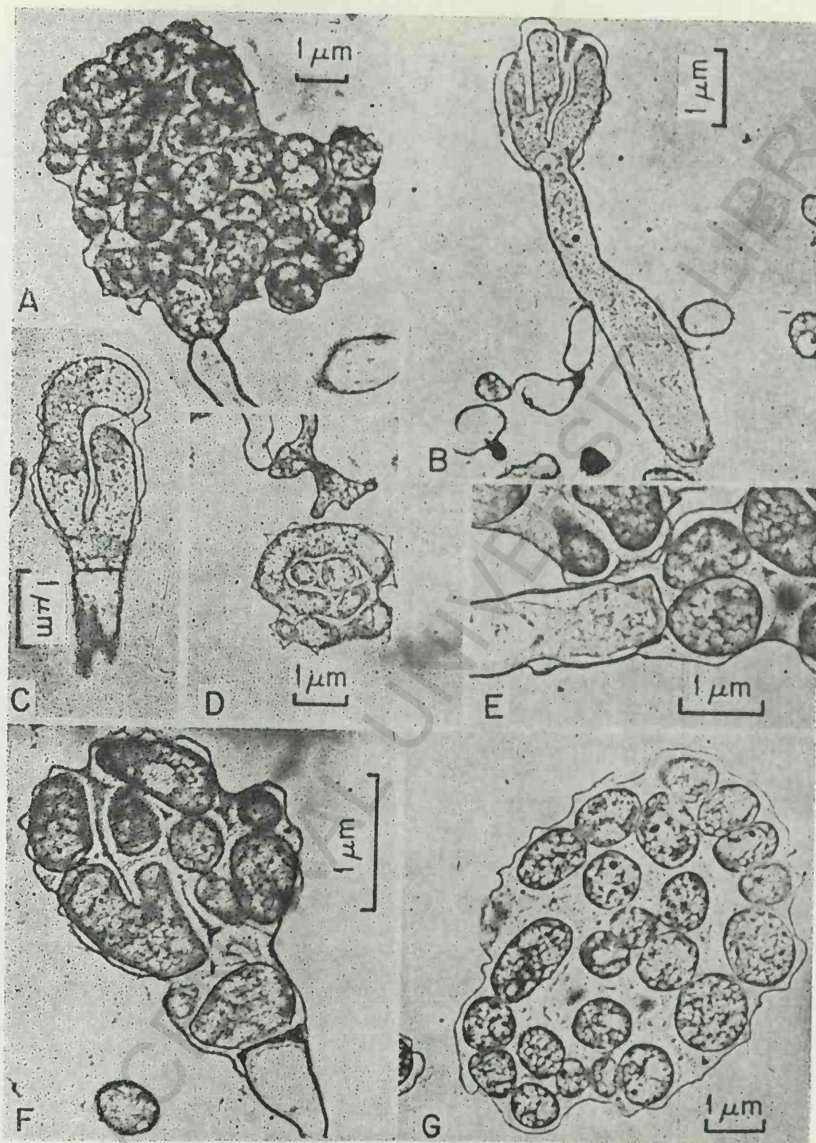








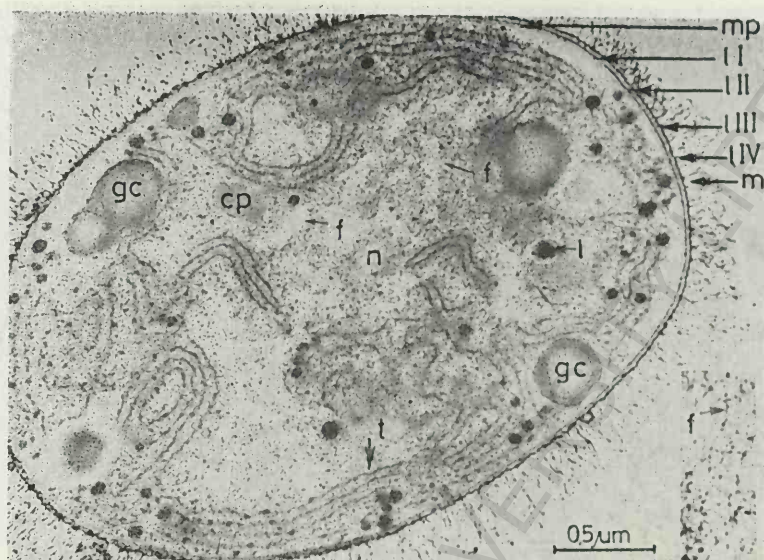
Pl. 101 — Microelectronografia conidiosporilor de la șase specii diferite de *Streptomyces*, ilustrind diferite tipuri de structură și ornamentare a suprafeței. A. Spori netezi *(S. cacaoi)*. B. Spori cu prelungiri aciculare scurte („spini") *(S. hirsutus)*. C. Spori cu spini verucoși *(S. griseoplanus)*. D. Spori de tip „falangiform" *(S. aureofaciens)*. E. Spori cu spini lungi ascuțiți *(S. fasciculatus)*. F. Spori cu filamente ca niște fire de păr *(S. flavoviridis)* (după Tresner, 1968).

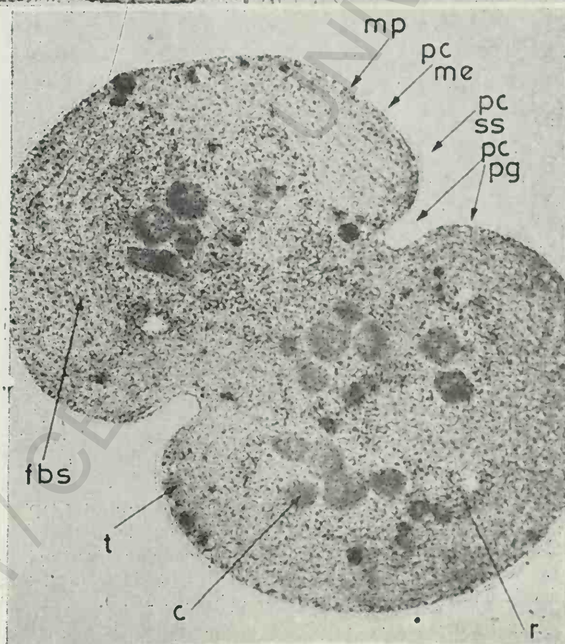


Pl. 102 — Secţiuni prin sporangiul de *Actinoplanes* în diferite stadii de dezvoltare. Microelectronografii. A. Sporangiu matur (după 4 zile). B. C. D. Sporangii imature (2 zile). E. F. Sporangii mature (4 zile) la care se vede peretele sporangiului, continuîndu-se cu teaca sporoforului. G. Sporangiu matur (4 zile) (după Lechevalier şi Holbert, 1965).

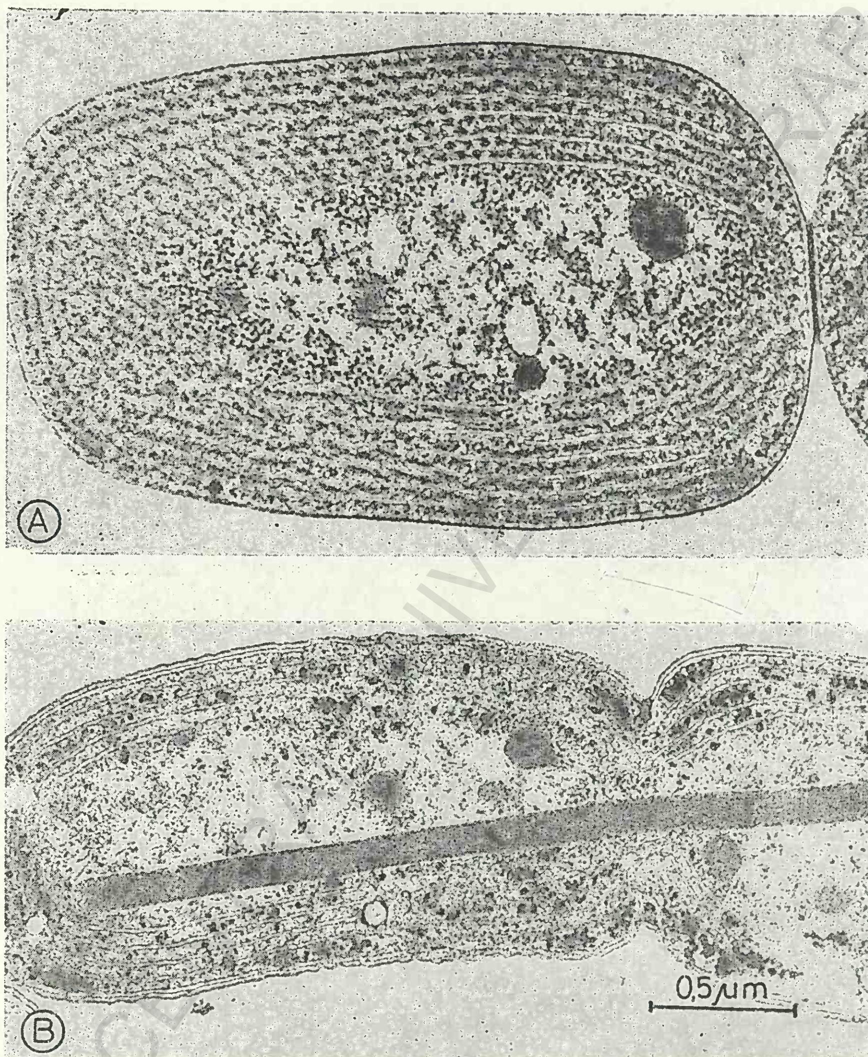


Pl. 103 — Microelectronografia unei secţiuni printr-un sporangiu imatur de *Actinoplanes* (după Lechevalier, 1965).

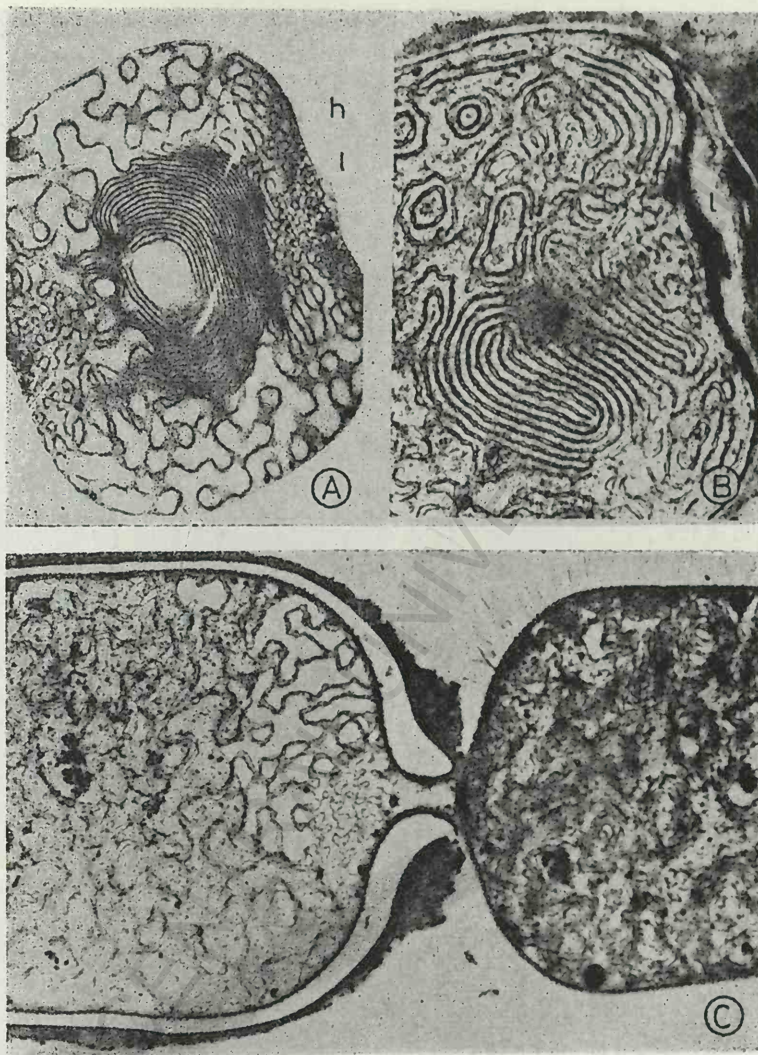




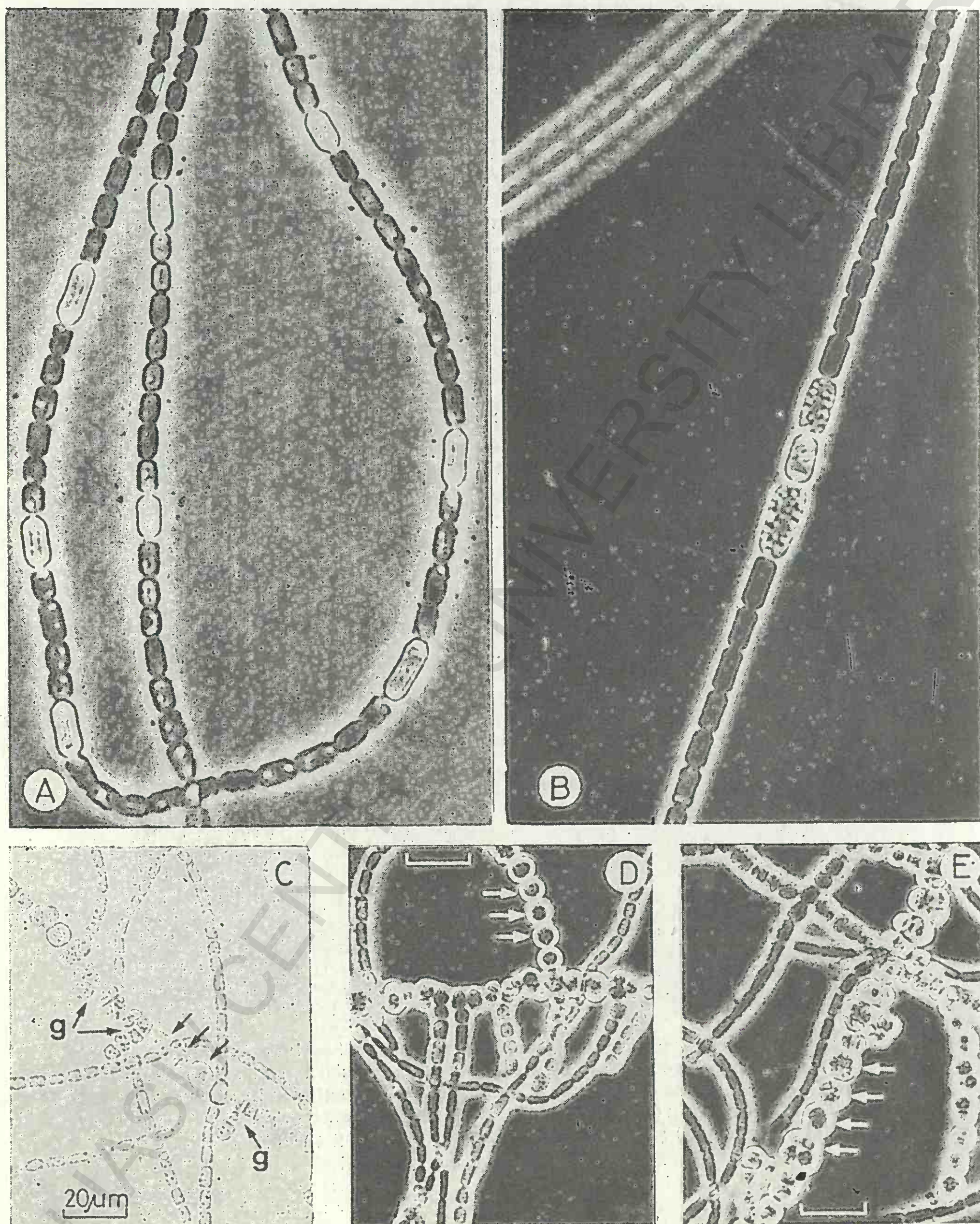
Pl. 104 — Cianobacterii. A. *Anabaena variabilis*. Microelectronografie pe secțiune ultrafină: m — strat mucos; LI—LIV — straturi ale peretelui celular; mp — membrana plasmatică; t — tilacoizii; n — material nuclear; f — zonă fibrilară; gc — granule de cianoficină; cp — corp poliedric; l — incluziuni lipidice (după Leak, din Volk, 1973). B. *Synechocystis*. Microelectronografie pe secțiune ultrafină a unei celule în curs de diviziune: mp — membrana plasmatică; pc — perete celular; me — membrana externă; ss — stratul structurat; t — tilacoid; fbs — ficobilisomi (după Stanier, 1977).



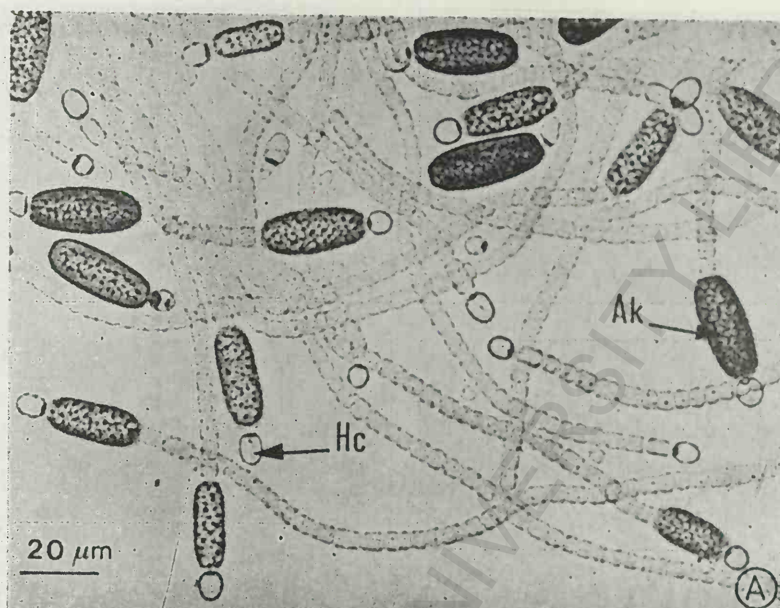
Pl. 105 — A. Secţiune printr-o cianobacterie filamentoasă din grupul LPP *(Lyngbya-Plectonema—Phormidium)*, evidenţiind şirurile corticale paralele de tilacoizi, purtind ficobilisomi (după Stanier, 1977). B. *Anacystis nidulans* pe cale de diviziune. Microelectronografie pe secţiune ultrafină. Se observă un corp poliedric foarte lung care traversează cele două celule (după Gantt şi Conti, 1969).

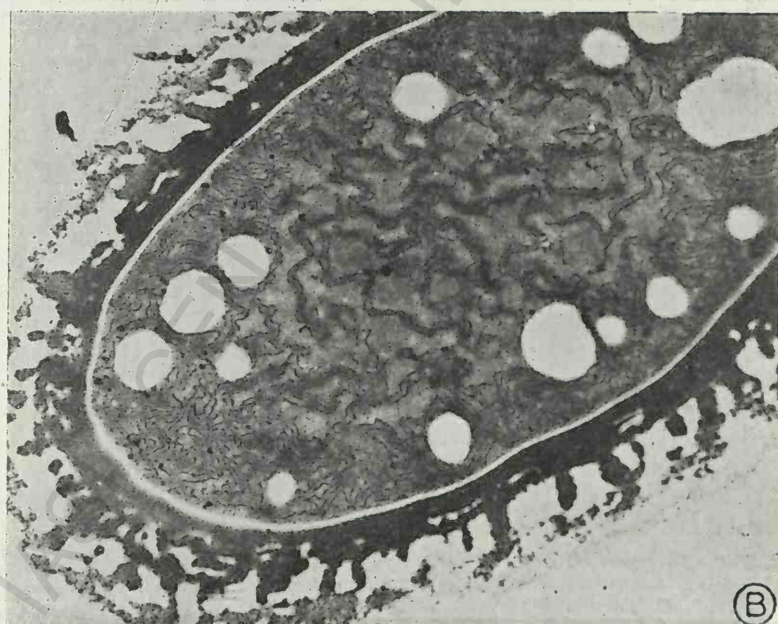


Pl. 106 — *Anabaena cylindrica*. Microelectronografii. A. Secţiune aproape mediană printr-un heterochist; B. Secţiune în regiunea polară; sînt evidenţiate sistemele de membrane concentrice aflate în contact cu regiunea în „fagure de miere". stratul omogen (h) şi laminar (l) al învelişului extern. C. Celulă vegetativă (dreapta) şi heterochist (stînga) (după Lang şi Fay, 1971).

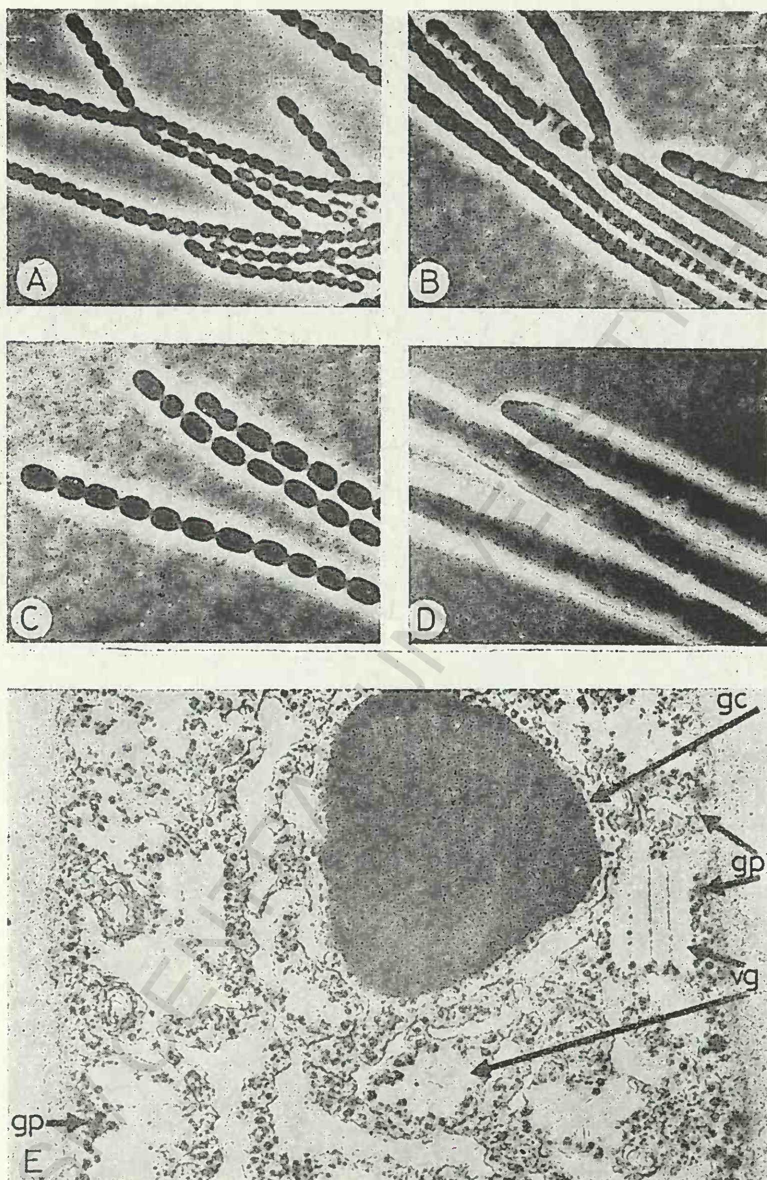


Pl. 107 – Celule vegetative și heterochiști de *Anabaena cylindrica*: se observă spațierea regulată a heterochiștilor (A) (după Wilcox, 1975). B. Lanț de celule vegetative care conțin un heterochist flancat de o pereche de akineți (după Carr, 1973). *Fischerella* PCC: C. Filament matur cu șiruri de akineți (→), din care numeroși sînt în curs de germinare (g), dînd naștere la ramificații laterale. D. E. Preparate similare examinate prin microscopie în contrast de fază pentru a evidenția akineții foarte refringenți (marcați cu săgeți) (după Rippka și Stanier, 1979).

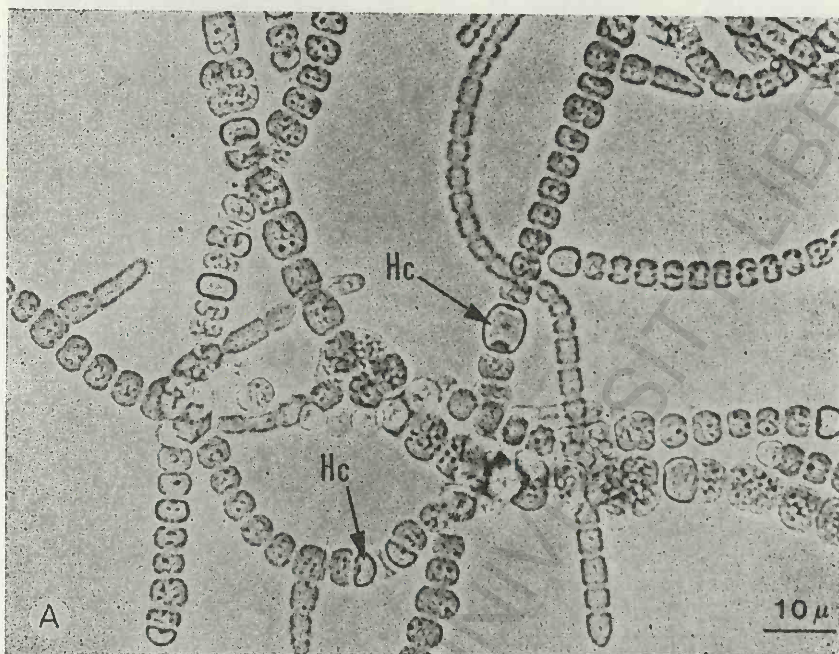


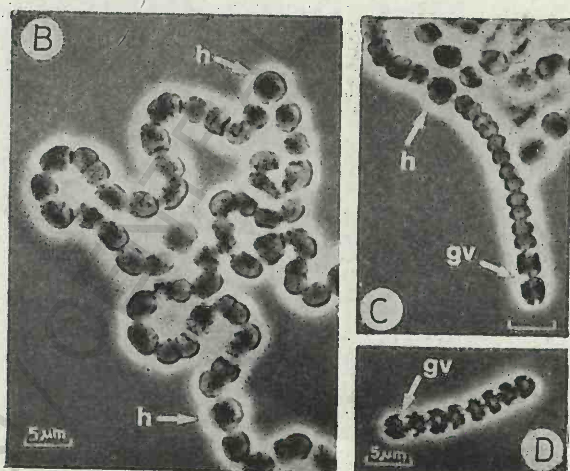


Pl. 108 — *Cylindrospermum*. **A.** Cianobacterie care produce atît heterochiști localizați terminal (Hc), cît și akineți (Ak) localizați subterminal (după Stanier, 1977). **B.** Secțiune ultrafină printr-un akinet; se observă stratul fibrilar dens și granulele mari de cianoficină (după Miller și Lang, 1968).

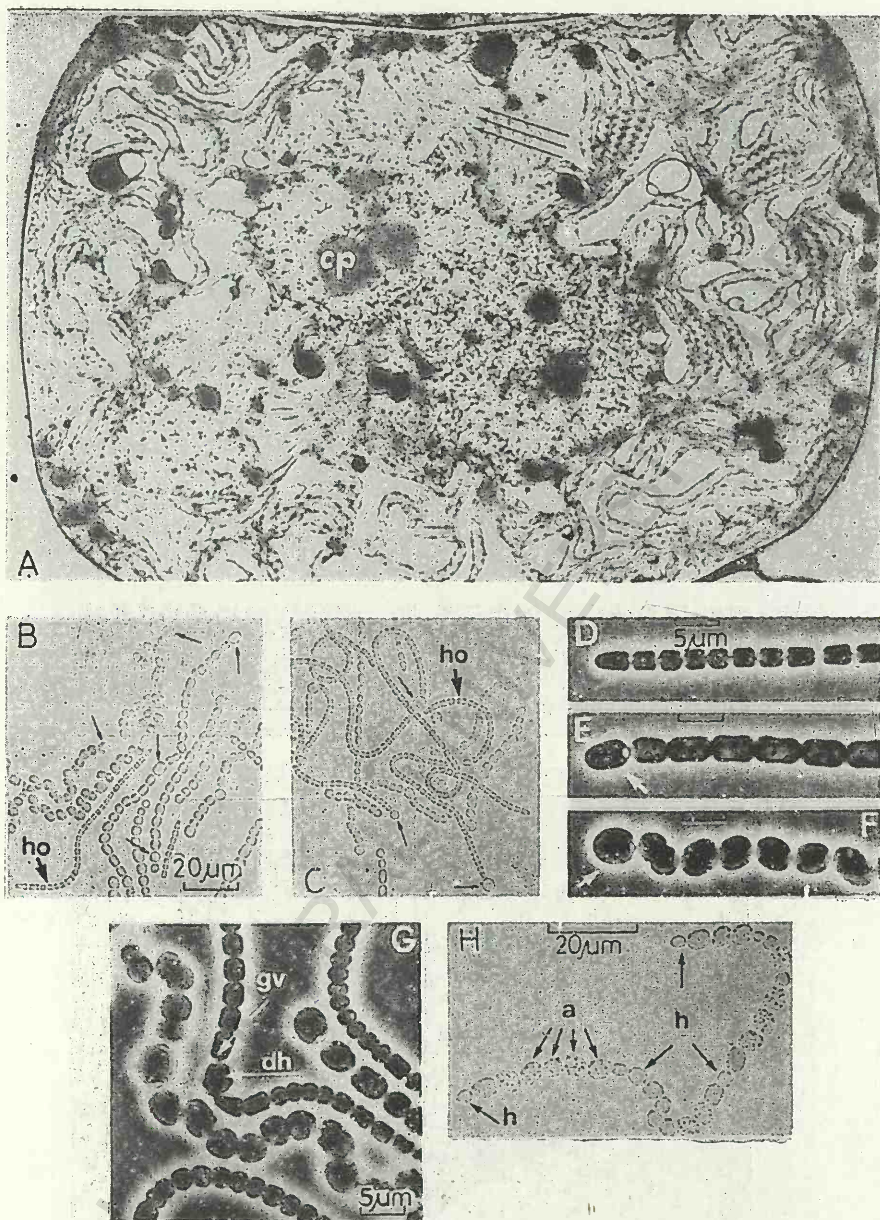


Pl. 109 — Cianobacterii din grupul *Lyngbya — Plectonema — Phormidium*, evidenţiind forma celulelor. **A.** *Phormidium fragile.* **B.** Tulpina termofilă PCC 7505. **C.** Tulpina PCC 7408 izolată din rîul Tamisa, denumită greşit *Pseudoanabaena catenata.* **D.** *Microcoleus* sp., microscopic în contrast de fază (după Rippka şi colab., 1979). **D.** *Aphanizomenon flos-aquae*: granule poliglucozidice (gp), granule de cianoficină (gc) şi vacuole cu gaze (vg) (după Wildman, 1974).

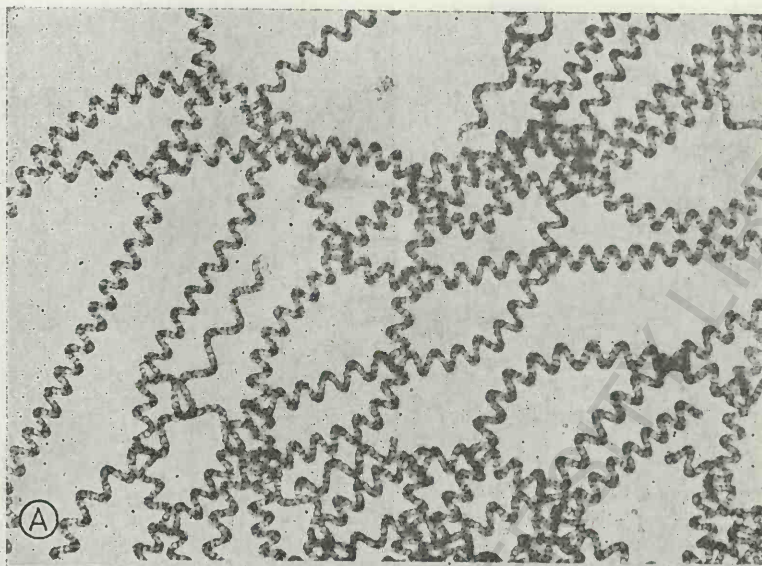


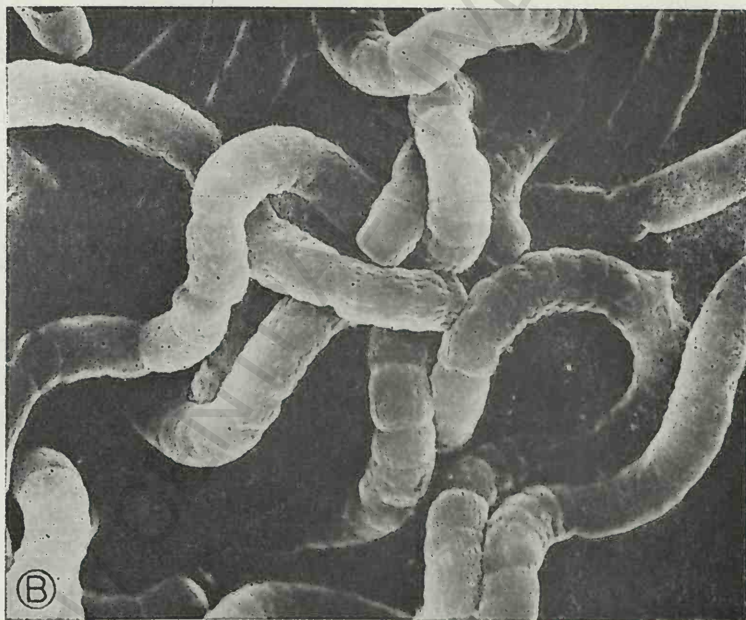


Pl. 110 — Cianobacterii. A. *Fischerella* tulpina 29 538 ATCC, cianobacterie producătoare de heterochiști (Hc), cu trihom parțial multiseriat și ramificații laterale (după Stanier și G. Cohen-Bazire, 1977). B.—D. *Nostoc* tulpina PPC 6 705 producătoare de hormogonii care conțin vacuole cu gaze (gv), distribuite neregulat, trihom matur cu heterochiști (h) terminali și intercalați. C. Modul de formare al hormogoniului imediat înainte de eliberarea sa. D. Hormogoniu scurt conținînd vacuole cu gaze. Imagini în contrast de fază (după Rippka și Stanier, 1979).

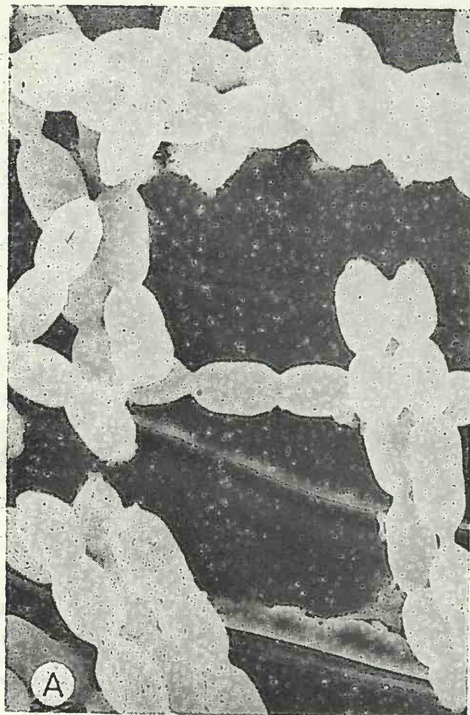


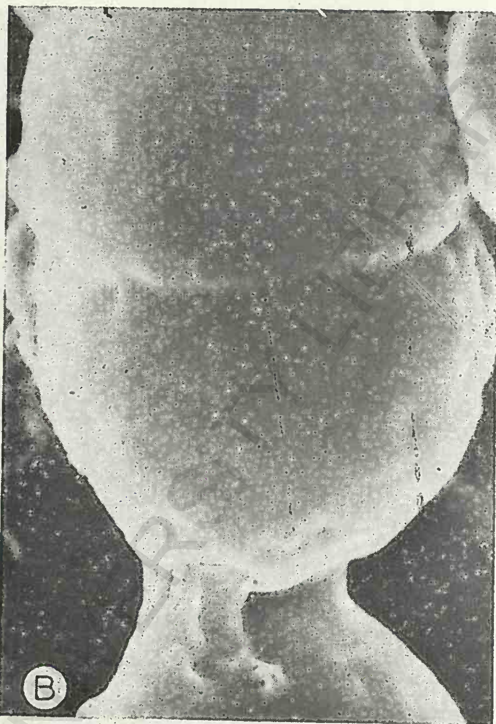
Pl. 111 — Cianobacterii. **A.** *Fremyella diplosiphon.* Microelectronografie pe secţiune ultrafină. Zona nucleară conţine corpi poliedrici (cp). Ficobilisomii apar ca granule mici colorate închis, ataşate de lamele (săgeţi) (după Gantt şi Conti, 1966). **B. C.** *Nostoc.* B. filamente mature, hormogonii (ho) şi heterochişti (→) ; C, formarea hormogoniilor în apropierea heterochiştilor (→) care se diferenţiază din celulele vegetative ale trihomului matur şi au dimensiuni mai mari. **D.—F.** Stadii succesive în dezvoltarea unui hormogoniu recent eliberat dintr-un trihom vegetativ matur. Se observă asemănarea hormogoniului (D) cu specia *Pseudoanabaena* (constricţii celulare şi vacuole polare cu gaze), ca şi mărirea celulară, pierderea vacuolelor cu gaze şi formarea de heterochişti (→), care însoţesc dezvoltarea hormogonială (E, F), **G.** Heterochist intercalat degenerat (dh) din care se detaşează un hormogoniu nou care se divide rapid. Vacuolele cu gaze (gv) sînt deja prezente în celulele adiacente heterochistului. **H.** Trihom matur cu şiruri de akineţi (a) diferenţiaţi, tipic pentru *Nostoc,* median între doi heterochişti, niciodată adiacent acestora ; diferenţierea succesivă a akineţilor de ambele laturi ale celui iniţial poate duce la apariţia de akineţi adiacenţi heterochiştilor (B, C, H, foto în cîmp clar ; D—G contrast de fază) (după Rippka, 1979).

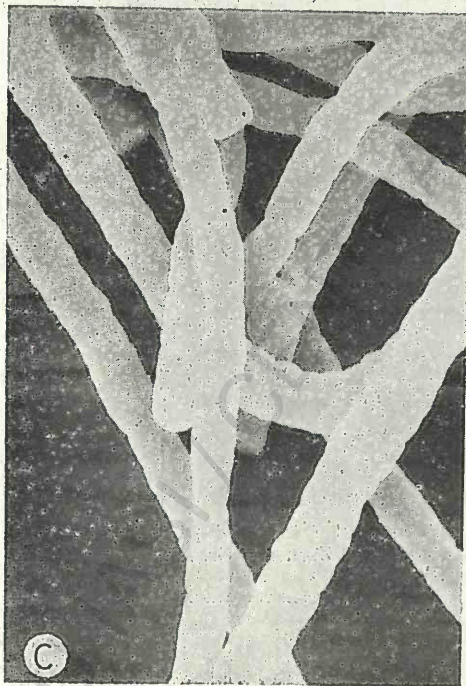


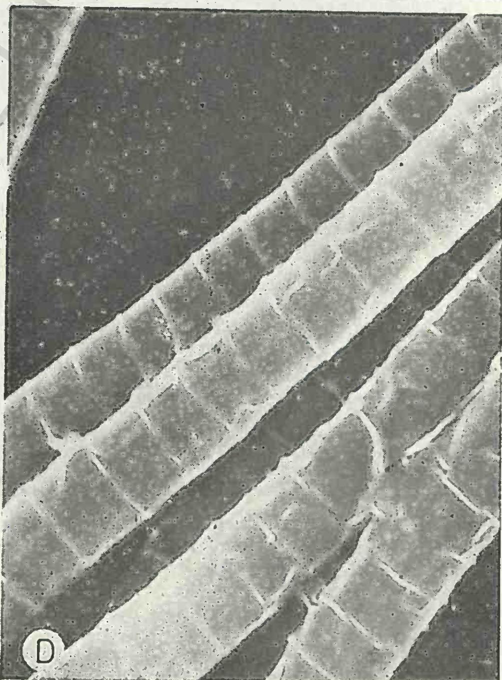


Pl. 112 — *Spirulina platensis*. A. Aspect la microscopul fotonic (după G. Popovici, 1981). B. Aspect la microscopul scanning (după Zarnea și Gr. Mihăescu, 1982).

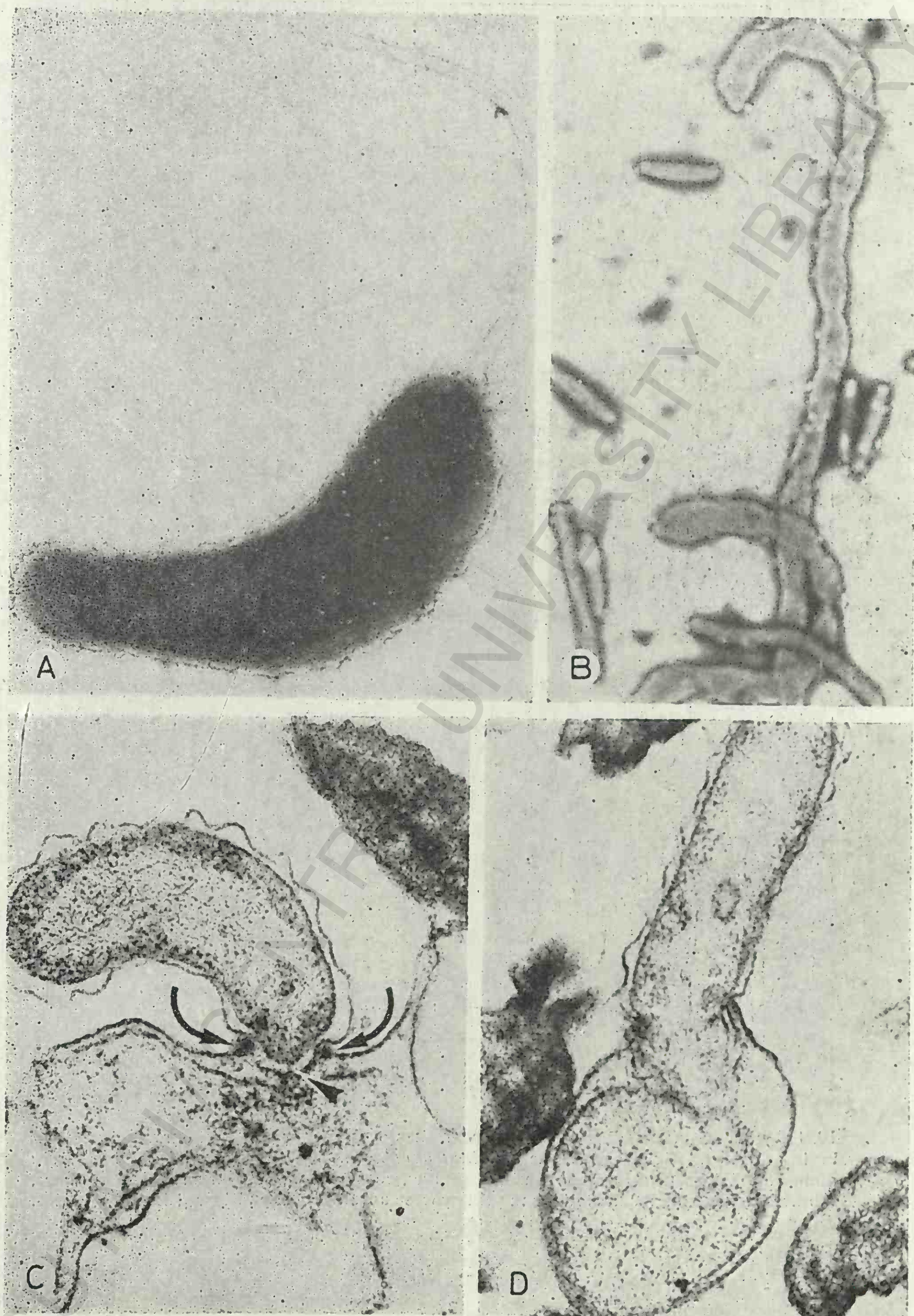




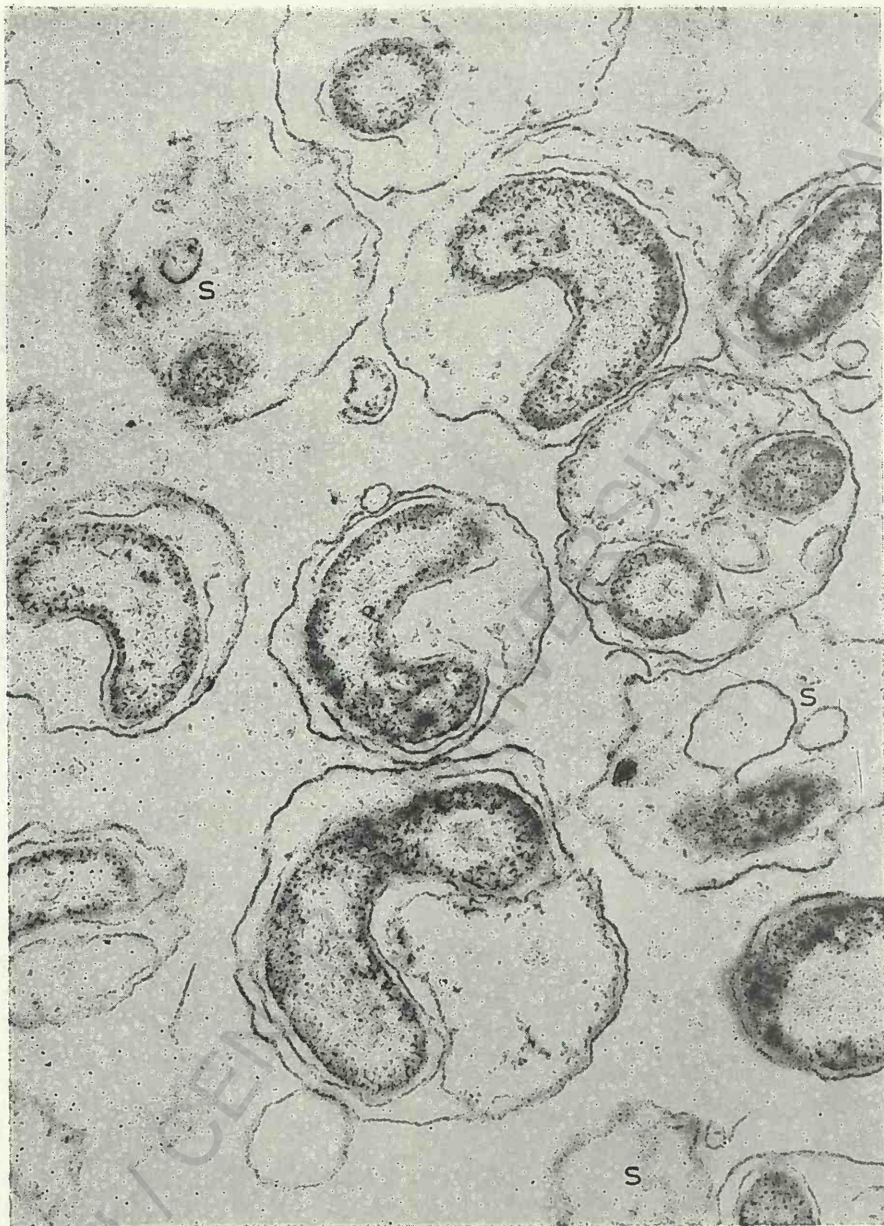




Pl. 113 — Cianobacterii. Aspecte la microscopul electronic cu scanning. **A.** *Anabaena* sp. **B.** *Nostoc* sp. **C.** *Plectonema* sp. **D.** *Oscillatoria* sp. (după Zarnea şi Gr. Mihăescu, 1983).



Pl. 114 — *Bdellovibrio bacteriovorus*. Microelectronografii : **A.** În faza staționară, după colorație negativă (după Diedrich, 1970). **B.** Forme celulare lungi, cultivate 16 ore în condiții standard pe extracte de *Pseudomonas aeruginosa*, asociate cu forme mici normale (după Reiner și Shilo, 1969). **C.** Începutul pătrunderii în bacteria *Salmonella typhimurium*. **D.** După pătrunderea parțială între peretele celular și membrana citoplasmatică a bacteriei-gazdă (după Cateau,, Petitprez și Vivier, 1969).



Pl. 115 — *Bdellovibrio bacteriovorus*. Microelectronografia unor celule în curs de dezvoltare în interiorul bacteriei parazitate *Erwinia amylovora*. S — sferoplaşti de *E. amylovora* rămaşi după dezorganizarea conţinutului celular, consecutivă infecţiei cu *B. bacteriovorus*, sub acţiunea enzimelor acestuia, sau prin procese autolitice (după Starr şi Baigent, 1966).

dezvolta într-un complex multicelular care are însă în mod evident un potenţial de supravieţuire superior faţă de cel al unei celule izolate a speciei respective, în acelaşi mediu, şi o activitate intercelulară între celulele apărute în complexul care a suferit diferenţierea. Un exemplu este

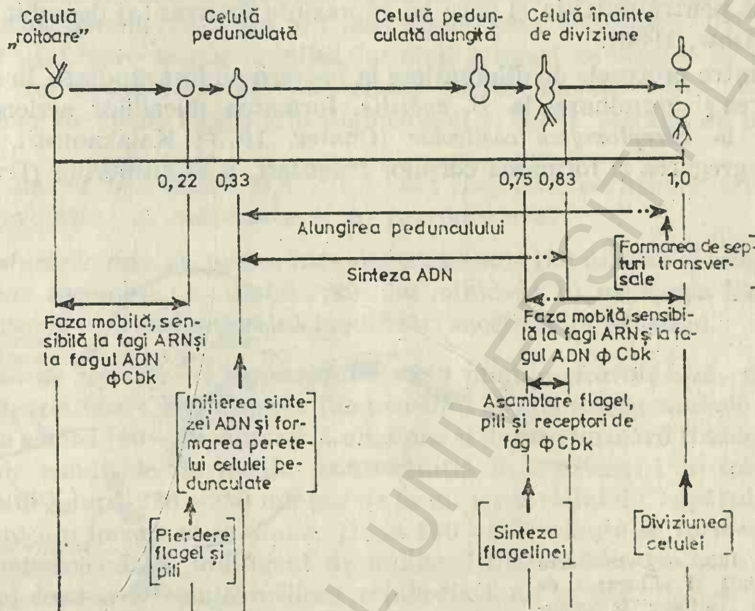


Fig. 166. — Reprezentarea schematică a ciclului de viaţă la *Caulobacter crescentus* (după Shapiro, 1976).

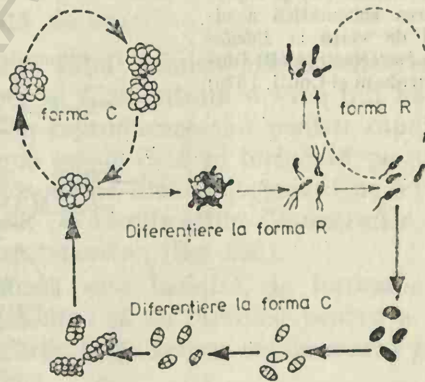
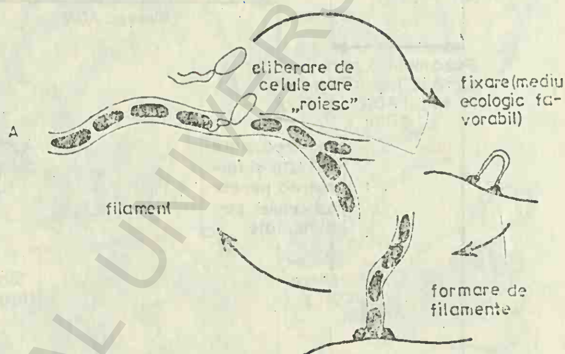


Fig. 167. — *Geodermatophilus* sp. — ciclu de creştere polimorf. Tranziţia morfogenetică şi diferenţierea între formele C şi R sînt rezultatul modificărilor de pH intracelular, induse de diferiţi cationi mono- şi bivalenţi, ca şi de unele amine organice (după Ishiguro şi Wolfe, 1970).

cel al cianobacteriilor „multicelulare" *(Anabaena cylindrica)* al căror filament de celule este considerat de Wilcox şi colab. (1973) ca un organism unic, deşi nu este sigur că diferenţierea akineţilor, heterochiştilor şi celulelor terminale este rezultatul unor relaţii intercelulare (Mitchinson, 1972). Este evident însă că „organismul multicelular" filamentos are o

serie de avantaje faţă de celulele izolate ale aceleiaşi specii, decurgînd din capacitatea de deplasare a trihomului prin alunecare, proprietatea heterochistului de a fixa N_2 molecular în condiţii aerobe şi formarea unei celule de repaus per filament (Carr şi Bradley, 1973). În special în mediile acvatice, formarea asociaţiilor de bacterii „coloniale" prin reţinerea de bacteria-mamă a descendenţilor săi într-o zonă limitată s-a dovedit adecvată pentru nutriţie şi pare să reprezinte un avantaj deosebit pentru specie (Dow, 1980).

Dintre procesele de diferenţiere la bacterii au fost studiate, în special, sporularea şi germinarea la *B. subtilis*, formarea miceliilor aeriene şi a sporilor la *Streptomyces coelicolor* (Chater, 1973; Kalakaoustii, 1976), roirea, agregarea şi formarea corpilor fructiferi, a mixosporilor (Dworkin, 1975).



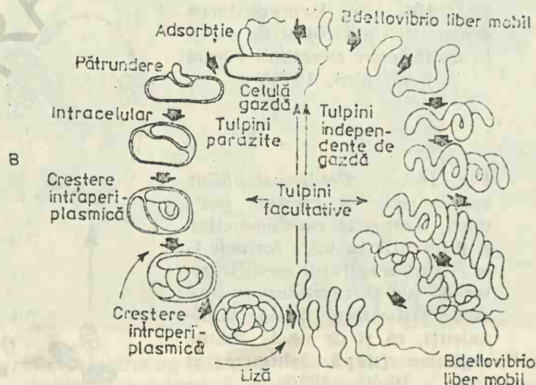


Fig. 168. — Dezvoltarea colonială şi eliberarea de celule „roitoare" la *Sphaerotilus natans* (A) şi reprezentarea schematică a ciclului de viaţă la *Bdellovibrio bacteriovirus* (B) (după Burnham şi Conti, 1970)

La *B. subtilis*, procesul de sporogeneză implică intrarea în acţiune a cel puţin 42 de gene *spo* (după Hranueli, 1976) între 33 şi 59), ceea ce demonstrează complexitatea procesului. Cum mulţi loci sînt situaţi la distanţă pe harta genetică, este probabil că fiecare are, pe lîngă genele structurale, elementele sale de punere în funcţiune şi, ca atare, pot fi

considerați ca operoni distincți, a căror transcriere este specific „deschisă" în cursul procesului de diferențiere (Piggot, 1979).

Morfogeneza și diferențierea la *Rhodomicrobium vannielii*

R. vannielii este o bacterie fotoheterotrofă, cu morfologie neobișnuită: celule ovoide (2—3 μm × 1 μm) legate prin filamente (0,3 μm × × 2—30 μm), care se pot ramifica formînd grupuri de celule. În culturi prezintă trei tipuri de celule: a) celule foarte mobile care „roiesc", b) complexe de celule legate prin filamente și c) celule unghiulare imobile (exospori).

Celula cea mai tînără (0,8 × 1,5 μm), flagelată, peritriche, are două faze de evoluție: a) maturarea și b) reproducerea.

Maturarea este un proces care durează 130—150 minute și evoluează în trei faze succesive: a) mobilă (20—30 minute); b) pierderea flagelilor (15 minute) și c) terminală (fără modificări morfologice externe).

Faza de reproducere durează 200—240 minute și evoluează, de asemenea, în trei faze: a) formarea filamentului la una sau la ambele extremități ale celulei (40—50 minute). Lungimea și durata formării filamentului depind de condițiile de mediu (concentrația în nutrienți); b) formarea „mugurelui" după 220—250 minute de la inițierea ciclului: capătul distal al filamentului începe să se umfle. După 150—180 minute se formează un singur mugure, odată, indiferent de numărul filamentelor pe care le are celula; c) formarea celulelor-fiice: celula-fiică nu crește, dar se separă fie prin diviziune binară la joncțiunea cu filamentul, fie prin sinteza unui „dop" în filament la mică distanță de ea.

Formarea celulelor care roiesc. Cînd celulele-mamă eliberează o celulă „roitoare" mobilă, polul liber al filamentului devine din nou disponibil pentru un al doilea ciclu de reproducere sau pentru ramificare. Cînd creșterea este unipolară, a doua celulă-fiică se formează pe un filament ramificat din cel dintîi. A treia celulă-fiică se formează pe o ramificație a filamentului al doilea ș.a.m.d. (= ramificațiile filamentelor se formează numai pe filamente recent sintetizate), (fig. 168).

Fiecare celulă-fiică nou formată este însoțită de formarea unui „dop" în filament, *înainte* ca filamentul să se ramifice pentru a forma celula-fiică următoare. În toate cazurile însă, fiecare celulă-mamă nu formează mai mult de patru celule-fiice.

Reproducerea la *R. vannielii* poate duce la formarea a trei tipuri de celule: 1) *celule vegetative-fiice* care rămîn legate de celula-mamă, dar separate funcțional de un perete transversal sau „dop" crescut în filament; 2) *celule vegetative mobile* care se separă prin diviziune binară de celula-mamă filamentoasă la joncțiunea dintre filament și celula-fiică nouă; 3) *exospori* asimetrici și unghiulari, termorezistenți, înconjurați frecvent de material capsular fibrilar (Gorlenko, 1969), care se separă

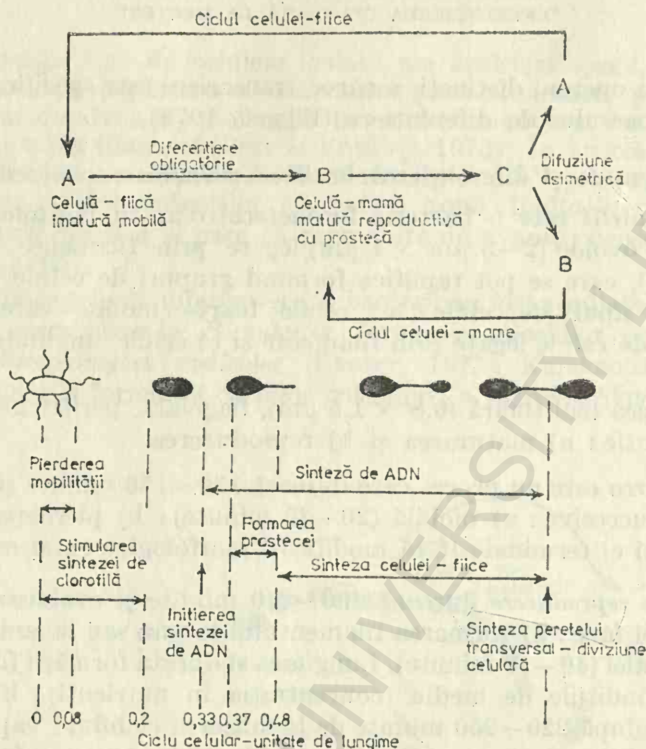


Fig. 169. — Particularităţile diferenţierii celulare la bacteriile prostecate dimorfe care înmuguresc. Sus : caracteristicile generale ale ciclului celular. Jos : principalele repere cunoscute în ciclul de viaţă al bacteriilor *Rhodomicrobium, Hyphomicrobium, Caulobacter* etc. (după Dow şi Whittenbury, 1980).

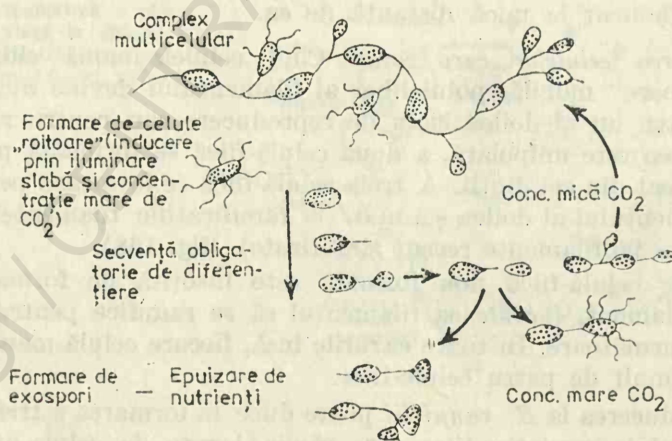


Fig. 170. — Reprezentarea schematică a ciclului de viaţă la *Rhodomicrobium vannielii* sub influenţa factorilor de mediu. Creşterea concentraţiei de CO_2 şi reducerea intensităţii luminii induc apariţia celulelor „roitoare". Dacă concentraţia nutrienţilor şi intensitatea luminii sînt satisfăcătoare, celula „roitoare" iniţiază ciclul de dezvoltare. Cînd iluminarea este foarte slabă chiar dacă toţi ceilalţi nutrienţi sînt în exces, dezvoltarea este oprită, iar cultura este limitată numai la celulele „roitoare" şi complexe multicelulare, fără stadiile intermediare (după Dow şi Whittenbury, 1980).

prin diviziune binară din filamentele celulei-mamă (cel mult patru exospori pentru fiecare celulă vegetativă-mamă) (fig. 169, 170).

Dealtfel, influenţa factorilor de mediu (concentraţia CO_2, concentraţia şi natura chimică a nutrienţilor etc.) este evidentă în cazul variaţiilor morfologice fenotipice (fig. 171) la mai multe specii bacteriene (Dow şi Whittenbury, 1980), de exemplu la *Chlorogloea fritschii*.

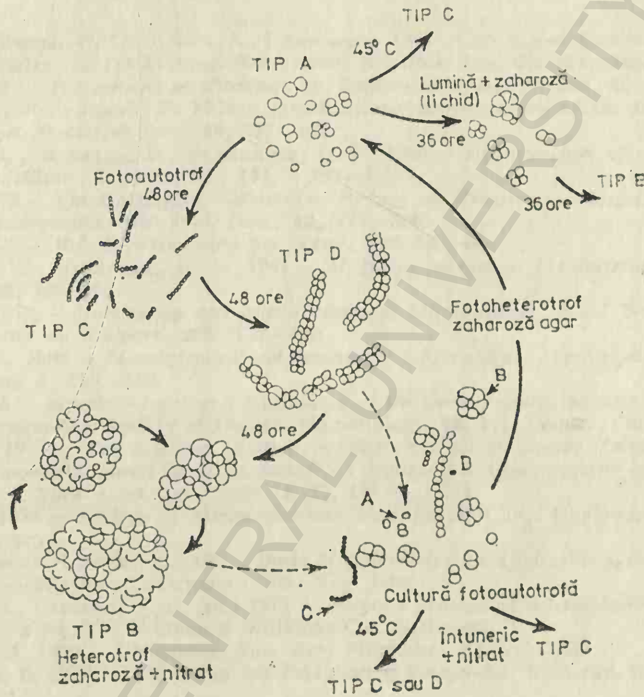
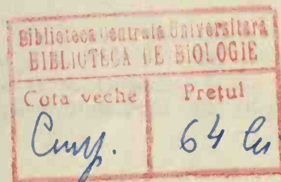


Fig. 171. — Reprezentarea schematică a modificărilor celulare la *Chlorogloea fritschii* sub influenţa factorilor de mediu. Tipul A — celule granulare (2,0× 3,0 μm), izolate sau grupate după diviziune. Tipul B — grămezi formate din grupuri mai mari de celule înconjurate de o teacă mucilaginoasă. Tipul C — celule mici (1 μm) grupate în filamente scurte. Tipul D — celule mai mari (1,5 μm) prezente ca filamente în curs de diviziune (după Evans şi colab., 1976).



Bibliografie selectivă

Adler, H. I., Fisher, W. D., Cohen, A., Hardigree, 1967 — *Miniature Escherichia coli cells, deficient in DNA*. Proc. Nat. Acad. Sci. (S.U.A.)., 57, 321—326.

Adler, Y. 1976 — *The sensing of chemicals by Bacteria.* Sci. Amer., 234, 40—47.

Aronson, A. I., Fitz-James, P. 1976 — *Structure and morphogenesis of the Bacterial Spore Coat.* Bacteriol. Rev., 40, 360—402.

Balkwill, D. L., Maratea, D., Blakemore, R. P. 1980 — *Ultrastructure of a magnetotactic Spirillum.* J. Bacteriol., 141, 1 399—1 408.

Becker, Y. 1978 — *The Chlamydia: Molecular Biology of Procaryotic obligate parasites of Eucaryocytes.* Microbiol. Rev., 42, 274—306.

Berg, C. H. 1975 — *How bacteria swim.* Sci. Amer., 233, 36—44.

Blakemore, R. P., Fraenkel, R. B. 1981 — *Magnetic navigation in Bacteria.* Sci. Amer., 245, 58—66.

Boatman, E. 1973 — *Morphology and ultrastructure of Mycoplasmas.* Ann. New York Academy of Sciences, 225, 172—180.

Bradley, D. E. 1980 — *Morphological and serological relationships of conjugative Pili.* Plasmid, 4, 155—169.

Braun, V. 1978 — *Structure-function relationships of the Gram-negative bacterial cell envelope.* Symposium Society of General Microbiology, 28, 111, Londra, Cambridge Press.

Brinton, C. C. 1965 — *The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial Pili and a molecular model for DNA and RNA transport in Gram-negative bacteria.* Trans. New York Acad. Sci., Seria II, 27, 1 003—1 054.

Brock, T. D. 1974 — *Biology of Microorganisms.* Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

Brock, T. D. Brock Katherine, 1978 — *Basic Microbiology with Applications*, ed. a 2 a Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

Buchanan, R. S., Gibbons, N. E. (ed.) 1974 — *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, ed. a 8-a, The William & Willkinks Co., Baltimore.

Caldwell, H. D. 1980 — *Chlamydia.* Ann. Rev. Microbiol., 34, 285—309.

Canale-Parola, E. 1977 — *Physiology and Evolution of Spirochetes.* Bacteriol. Rev., 41, 181—204.

Canale-Parola, E. 1978 — *Motility and chemotaxis of Spirochetes.* Ann. Rev. Microbiol., 32, 69—99.

Chang, H. Y. Y., Allen, M. M. 1974 — M. M. 1974 — *The isolation of Rhapidosomes from the blue-green alga Spirulina.* J. Gen. Microbiol., 18, 121—130.

Chater, K. F., Hopwood, D. A. 1973 — *Differentiation in Actinomycetes.* Symposium Society of General Microbiology, XXIII, „Microbial differentiation", 143—160, Cambridge Press. Londra.

Chet, I., Mitchell, R. 1976 — *Ecological aspects of microbial chemotactic behaviour.* Ann. Rev. Microbiol., 30, 221—239.

Costerton, J. W., Ingram, J. M., Cheng, K. Y. 1974 — *Structure and function of the cell envelope of Gram-negative bacteria.* Bacteriol. Rev., 38, 87—110.

Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, K. Y. 198 — *How becteria stick.* Sci. Amer., 238, 86—95.

Costerton, J. W., 1979 — *The role of electron microscopy in the elucidation of bacterial structure and function.* Ann. Rev. Microbiol., 33, 459—479.

Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, W. B. Jr. 1973 — *Microbiology*, ed. 2-a, Harper & Row Publ. Inc. Hagestown, Maryland.

DELIUS, H., WORCEL, A. 1974 — *Electron microscopic visualization of the folded Chromosome of Escherichia coli.* J. Mol. Biol., 82, 107—109.

DOETSCH, R. N., SJOBLAD, R. D. 1980 — *Flagellar structure and function in Eubacteria.* Ann. Rev. Microbiol., 34, 69—108.

DUCA, E., DUCA. M., FURTUNESCU, G. 1979 — *Microbiologie medicală.* Edit. didactică și pedagogică, București.

DUGUID, J. P. 1968 — *The function of bacterial fimbriae.* Arch. immunol. therap. exp., 16, 173—188.

DWORKIN, M. 1973 — *Cell-Cell interactions in the Myxobacteria.* Symposium Society of General Microbiology, XXIII, „Microbial differentiation", 125—142, Cambridge Press, Londra.

DWORKIN, N. 1979 — *The bacteria,* vol. VIII (cap. 1, *Spores, cysts and stalks*). Acad. Press Inc., New York, p. 2—83.

EASTERBROOK, K. B., MCGREGOR-SHAW, J. B., MCBRIDE, R. P. 1973 — *Ultrastructure of bacterial spines.* Canad. J. Microbiol., 19, 995—997.

EASTERBROOK, K. B., WILLISON, J. H. M., COOMBS R. W., 1976 — *Arrangement of morphological subunits in bacterial spinae.* Canad. J. Microbiol., 22, 619—629.

ECHLIN, P. 1970 — *The Photosynthetic apparatus in Prokaryotes and Eukaryotes.* XX[th] Symposium Society of General Microbiology, p. 221—248, Cambridge Press, Londra.

FOX, C. F. 1972 — *The structure of cell membranes.* Sci. Amer., 226, 30—38.

FRAZER, A. C., CURTISS, R. 1975 — *Production. Properties and Utility of Bacterial Minicells.* În : Current Topics in Microbiol. and Immunology, 69, 1—84.

FREESE, E. 1972 — *Sporulation of Bacilli a model for cellular differentiation.* Current Topics of Development Biol., 7, 85—124.

FRÈRE, J. M. 1977 — *La chimiotaxie chez les bactéries.* Bull. Inst. Pasteur, 75, 187—203.

GASSER, F. 1975 — *Microbiologie Générale. Bactéries et Bactériophages.* Ediscience McGraw-Hill Inc., Paris, New York.

GREENAWALT, J. W., WHITESIDE, T. L. 1975 — *Mesosomes : Membranous Bacterial Organelles.* Bacteriol. Rev., 39, 405—463.

GUNSALUS, I. C., SOKATCH, J. R., ORNSTON, L. N. 1979 — *The Bacteria.* vol. VII. *Mechanism of Adaptation.* Acad. Press, New York.

GUNSALUS, I. C., STANIER, R. Y. 1960 — *The bacteria. A Treatise on Structure and Function.* vol. I. *Structure.* Acad. Press, New York.

HAROLD, F. M. 1966 — *Inorganic Poplyphosphates in Biology : Structure, Metabolism and Function.* Bacteriol. Rev., 30, 772—794.

HAZELBAUER, G. L. 1980 — *Bacterial chemotaxis : Molecular biology of a sensory system.* Endeavour, 4, 67—73.

HENNING, U. 1975 — *Determination of cell shape in bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., 29, 45—57.

JOKLIK, W. K., WILLET, H. P. 1976 — *Zinsser's Microbiology,* ed. a 16-a. Appleton Century Crofts. Prentice-Hall. Inc., New York.

KAVENOFF, R., RYDER, O. A. 1976 — *Electron Microscopy of Membrane associated folded Chromosomes of E. coli,* Chromosoma, 55, 13—25.

KURLAND, C. G. 1977 — *Structure and function of the bacterial ribosome.* Ann. Rev. Biochem., 46, 173.

LAKE, J. A. 1976 — *The ribosome.* Sci. Amer., 105, 56—69.

LECHEVALIER, H. A., LECHEVALIER, M. P. 1967 — *Biology of Actinomycetes.* Ann. Rev. Microbiol., 21, 71—101.

LODISH, H. F. ROTHMAN, J. E. 1979 — *The Assembly of Cell Membranes.* Sci. Amer., 243, 38—53.

LURIA, S. E. 1960 — *The Bacterial Protoplasm : Composition and Organization in the Bacteria* (I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier eds.), vol. I, Acad. Press, New York.

MANDELSTAM, M. J. 1976 — *Bacterial sporulation : a problem in the biochemistry and genetics of a primitive developmental system.* Proc. Roy Soc. Londra, B, 193, 89—106.

MANILOFF, J., MOROWITZ, H. J. 1972 — *Cell biology of the Mycoplasmas.* Bacteriol. Rev., 36, 263—290.

MENDELSON, N. H., REEVE, J. N. COLE, R. M. 1974 — *Pysiological studies of Bacillus subtilis minicells.* J. Bacteriol. 31, 1 966 — 1 967.

NESTER, E. W., ROBERTS, C. E. 1973 — *Microbiology. Molecules, microbes and man.* Holt. Rinehart & Winston Inc., New York.

NOMURA, M., MORGAN, E.A. 1977 — *Genetics of Bacterial Ribosomes.* Ann. Rev. Genet., 11, 297—347.

ORMSBEE, R. A. 1969 — *Rickettsiae as organisms.* Ann. Rev. Microbiol., 23, 275—292.

Osborn, M. J., Wu, H.C.P. 1980 — *Proteins of the outer membrane of Gram-negative Bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., 34, 369—422.

Ottow, J.C.G., 1975 — *Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili.* Ann. Rev. Microbiol., 29, 80—105.

Pamphilis, M. L. De Adler, J. 1971 — *Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope : specific attachment to the outer lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane.* J. Bacteriol., 105, 396—407.

Parkes, K., Walsby, A. E., 1981 — *Ultrastructure of a Gas-vacuolate Square Bacterium.* J. Gen. Microbiol., 126, 503—506.

Parkinson, J. S. 1977 — *Behavioral genetics in bacteria.* Ann. Rev. Genet., 11, 397—414.

Ploaie P. G., Mycoplasma și bolile proliferative la plante, 1974, Ed. Ceres, București.

Pelczar, M. J., Reid, R. D., Chan, E.C.S., 1977 — *Microbiology*, ed. a 4-a, McGraw Hill Book Co., New York.

Piggot, P. J., Coote, J. G. 1976 — *Genetic Aspects of bacterial endospore formation.* Bacteriol. Rev., 40, 908—962.

Poindexter, J. S. 1981 — *The Caulobacters : ubiquitous unusual Bacteria.* Microbiol. Rev., 45, 124—179.

Razin, S. 1978 — *The Mycoplasmas.* Microbiol. Rev., 42, 414—470.

Reusch, V. M., Burger, M. M. 1973 — *The bacterial Mesosome.* Biochim. Bioph. Acta, 300, 79—104.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y. 1979 — *Generic Assignments, Strain. Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.* J. Gen. Microbiol., 111, 1—61.

Satir, P. 1974 — *How cilia move.* Sci. Amer., 231, 45—52.

Schachter, J. 1980 — *Chlamydiae.* Ann. Rev. Microbiol., 34, 285—309.

Schleifer, K. H., Kandler, O. 1972 — *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.* Bacteriol. Rev., 36, 407—477.

Schmidt, J. M. 1971 — *Prosthecate Bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., 25, 93—110.

Sengbusch, P. von, 1979 — *Molekular und Zellbiologie.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Shapiro, L. 1976 — *Differentiation in the Caulobacter cell cycle.* Ann. Rev. Microbiol., 30, 377—407.

Shively, J. M. 1974 — *Inclusion Bodies of Prokaryotes.* Ann. Rev. Microbiol., 28, 167—187.

Smibert, R. M. 1973 — *Spirochaetales a Review.* Current Rev. Microbiol., 2, 491—552.

Sokatch, J. R., Ferretti, J. J., 1976 — *Basic Bacteriology and Genetics.* Year Book Med. Publ. Inc. Chicago.

Sokatch, J. R., 1979 — *The bacteria.* vol. VII. *Roles of appendages and surface layers in adaptation of bacteria to their environment.* Academic Press Inc., New York.

Sonea, S., Panisset, M. 1980 — *Introduction à la nouvelle bactériologie.* Les Presses de l'Université de Montréal, Masson, Paris.

Springer, E. L., Roth, I. L. 1973 — *Ultrastructure of the capsule of Klebsiella pneumoniae and slime of Enterobacter aerogenes revealed by freeze etching.* Archiv Mikrobiol., 93, 277—286.

Stanier, R. Y., Van Niel, C. B. — 1962 — *The Concept of a Bacterium.* Archiv Mikrobiol., 42, 17—35.

Stanier, R. Y. 1964 — *Toward a definition of the Bacteria.* În : *The Bacteria.* vol. V. Academic Press Inc., New York.

Stanier, R. Y. 1970 — *Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance.* Symposium Society General Microbiol., 20, 1—38 Cambridge Press, Londra.

Stanier, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A. 1970 — *The Microbial World.* Prentice-Hall Inc., Londra.

Stanier, R. Y., Lwoff, A. 1973 — *Le concept de microbe de Pasteur à nos jours.* La nouvelle Presse médicale, 18, 1 191—1 198.

Stanier, R. Y. 1977 — *The position of Cyanobacteria in the world of phototrophs,* Carlsberg Res. Commun., 42, 77—98.

Starr, M. P., Skerman, V.B.D. 1965 — *Bacterial diversity : The natural History of selected morphologically unusual bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., 19, 409—454.

Stewart, W.D.P. 1980 — *Some aspects of structure and function in N_2-fixing Cyanobacteria.* Ann. Rev. Microbiol., 34, 497—536.

Sussman, A. S., Douthit, H. A. 1973 — *Dormancy in microbial spores.* Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 311—352.

THOMAS, C.G.A. 1979 — *Medical Microbiology*, ed. a 4-a, Baillière Tindall, Londra.
WALKER, P.D. 1970 — *Cytology of spore formation and germination*. J. Appl. Bact., **33**, 1—12.
WALSBY, A. E. 1972 — *Structure and function of gas vacuoles*. Bacteriol. Rev. **36**, 1—32.
WALSBY, A. E. 1980 — *A square bacterium*. Nature (Londra), **283**, 69—71.
WATSON, J. D. 1977 — *Molecular Biology of the Gene*, ed. a 3-a, W. A. Benjamin Inc. New York S.U.A.
VEEN, W. L., VAN, MULDER, E. G., DEINEMA, M. H. 1978 — *The Sphaerotilus-Leptothrix Group of Bacteria*. Microbiol. Rev., **42**, 329—356.
WEIDE, H., AURICH, H. 1979 — *Allgemeine Mikrobiologie*. WEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
WEISS, E. 1973 — *Growth and physiology of Rickettsiae*. Bacteriol. Rev., **37**, 259—283.
WEISMANN, G., CLAIRBORNE, R. (ed.) 1975 — *Cell Membranes Biochemistry, Cell Biology and Pathology*. H. P. Publ. Co. Inc.
WILDERMUTH, H. 1970 — *Development and organization of the aerial mycelium in Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol., **60**, 43—50.
WILLISON, J.H.M., EASTERBROOK, K. B., COOMBS, R.W. 1977 — *The attachment of bacterial spinae*. Canad. Journ. Microbiol., **23**, 258—266.
WIREMAN, J. W., DWORKIN, M. 1975 — *Morphogenesis and developmental interactions in Myxobacteria*. Science (S.U.A.), **189**, 516—523.
WITTENBURY, R., DOW, C. S. 1977 — *Morphogenesis and differentiation in Rhodomicrobium vannielii and other budding and prosthecate bacteria*. Bacteriol. Rev., **41**, 754—808.
WOLK, C. P. 1973 — *Physiology and Cytological Chemistry of Blue-Green Algae*. Bacteriol. Rev., **37**, 32—101.
YAMAMOTO, T. 1967 — *Presence of Rhapidosomes in Various Species of Bacteria and their Morphological Characteristics*. J. of Bacteriol., **94**, 1 746—1 756.
YIÑO, T. 1977 — *Genetics of structure and function of bacterial flagella*. Ann. Rev. Genet., **11**, 161—182.
ZARNEA, G. 1963 — *Microbiologie*. Edit. didactică și pedagogică, București.
ZARNEA, G. 1970 — *Microbiologie generală*. Edit. didactică și pedagogică, București.
ZARNEA, G., MENCINICOPSCHI, G., BRAGAREA, ȘT. 1980 — *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*. Edit. tehnică, București.
ZAVADOVA, M. 1972 — *Le genre Mycoplasma*. Bul. Inst. Pasteur, Paris, **70**, 51—71.
ZECHOVSKY, N. 1973 — *Les formes L des bactéries*. Path. Biol., **21**, 1 117—1 126.

Redactor: ECATERINA GHICA
Tehnoredactor: MAGDALENA IACOB

Bun de tipar: 11 IX 1983. Format 16/70×100
Coli de tipar 26,75 Planşe 58 C.Z. pentru biblioteci mari şi mici: 576.8(021)=59


c. 116 I. P. „Informaţia"
str. Brezoianu nr. 23–25,
Bucureşti